

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-501626

(P2004-501626A)

(43) 公表日 平成16年1月22日 (2004.1.22)

(51) Int. Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 9/68

C 1 2 N 9/68

4 B 0 5 0

A 6 1 K 38/48

A 6 1 K 45/00

4 B 0 6 3

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 25/28

4 C 0 8 4

A 6 1 P 25/28

C 1 2 Q 1/37

C 1 2 Q 1/37

G 0 1 N 33/53

D

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 111 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-505835 (P2002-505835)
 (86) (22) 出願日 平成13年3月27日 (2001.3.27)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年12月26日 (2002.12.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2001/003481
 (87) 国際公開番号 W02002/000713
 (87) 国際公開日 平成14年1月3日 (2002.1.3)
 (31) 優先権主張番号 PCT/IB00/008
 (32) 優先日 平成12年6月26日 (2000.6.26)
 (33) 優先権主張国 国際事務局 (IB)

(71) 出願人 500466924
 ユニヴェルジテート チューリッヒ
 スイス国 チューリッヒ ヴィンタートゥー
 ーレルシュトラッセ 190
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100108774
 弁理士 橋本 一憲
 (72) 発明者 アグツィ アダリアノ
 スイス連邦共和国 チューリッヒ ミュー
 ルガッセ 21
 (72) 発明者 フィッシャー マイケル ボリス
 スイス連邦共和国 デュベンドルフ ポス
 ツェルグストラッセ 10
 Fターム (参考) 4B050 CC04 CC07 DD11 LL01 LL03
 最終頁に続く

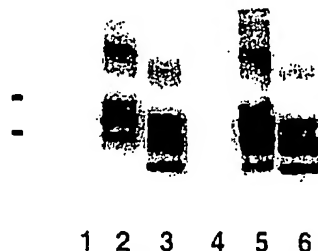
(54) 【発明の名称】 血清および血漿中に見出されるプリオン結合活性を有する因子

(57) 【要約】

病原性プリオンタンパク質を濃縮および検出ならびに定量するための方法およびツール、ならびにプリオン病の検出および/または予防もしくは治療において用いられる物質が開示される。この物質は、血清および血漿中に見出されるプリオン結合活性を有する因子である。

Coupling Plasminogen Fibrinogen

	Plasminogen			Fibrinogen		
Scrapie	-	+	+	-	+	+
Prot. K	-	-	+	-	-	+



1 2 3 4 5 6

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

PrPSc と選択的に相互作用するが、PrPC と相互作用しない因子。

【請求項 2】

プラスミノゲン、プラスミノゲン断片、およびその誘導体から選択される、請求項 1 記載の因子。

【請求項 3】

PrPSc のカルボキシル末端と相互作用することを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の因子。

【請求項 4】

異なる種の PrPSc と相互作用可能であることを特徴とする、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の因子。

【請求項 5】

PrPSc および請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の因子を含む組成物。

【請求項 6】

PrPSc が因子に結合している、請求項 5 記載の組成物。

【請求項 7】

PrPSc が因子に非共有結合している、請求項 6 記載の組成物。

【請求項 8】

請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の因子および／または請求項 5 ～ 7 のいずれか一項に記載の組成物を含む担体。

【請求項 9】

磁気ビーズ、フィルター細片、マイクロタイタープレート、非磁気ビーズ、プラズモン表面共鳴プレート、マイクロアレイプレート、固体への相転移を受ける液体担体、およびそれらの組み合わせから選択される、請求項 8 記載の担体。

【請求項 10】

請求項 5 ～ 7 のいずれか一項に記載の組成物と特異的に相互作用するリガンド。

【請求項 11】

請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の因子、ならびに／または請求項 5 ～ 7 のいずれか一項に記載の組成物、ならびに／または請求項 8 もしくは 9 に記載の担体、ならびに／または請求項 10 記載のリガンドを含み、任意で、緩衝液、検出用試薬、および作業説明書のようなさらなる構成要素を含む、診断キット。

【請求項 12】

請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の因子および／または請求項 10 記載のリガンドを含む、薬学的組成物。

【請求項 13】

試料と、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の因子、および／または請求項 8 もしくは 9 記載の担体、および／または請求項 10 記載のリガンドとを接触させることを特徴とする、試料中の PrPSc を検出する方法。

【請求項 14】

以下の段階を含む、生物学的材料から PrPSc を除去する方法：

該材料と、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の因子、および／または請求項 8 もしくは 9 に記載の担体、および／または請求項 10 記載のリガンドとを接触させる段階。

【請求項 15】

試験しようとする生物の材料と、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の因子、および／または請求項 8 もしくは 9 に記載の担体、および／または請求項 10 記載のリガンドとを接触させることを特徴とする、ヒト伝達性海綿状脳症および動物のプリオン脳症を診断する方法。

【請求項 16】

ヒト伝達性海綿状脳症または動物のプリオン脳症を診断するための、請求項 1 ～ 4 のい

10

20

30

40

50

れか一項に記載の因子、および／または請求項5～7のいずれか一項に記載の組成物、および／または請求項8もしくは9に記載の担体、および／または請求項10記載のリガンドの使用。

【請求項17】

生物学的材料からPrP^{Sc}を除去するための、および／または生物学的材料中のPrP^cを不活化するための、請求項1～4のいずれか一項に記載の因子、および／または請求項5～7のいずれか一項に記載の組成物、および／または請求項8もしくは9に記載の担体、および／または請求項10記載のリガンドの使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

10

発明の分野

本発明は、伝達性海綿状脳症を検出するための方法および因子ならびに個々の感染を予防および治療するための因子に関する。

【0002】

背景技術

入手可能な全ての証拠によると、プリオンと呼ばれる伝達性海綿状脳症を引き起こす因子は情報である核酸を欠き、正常な宿主タンパク質(PrP^cと呼ばれる)をそれに似たものに変換することができる「感染」タンパク質(PrP^{Sc}と呼ばれる)を含む。プリオン感染の結果として組織病理学的損傷およびその臨床後遺症が証明される唯一の器官系が神経系である(ブランダー(Brander)ら, 1996)。この考えは、ヒト伝達性海綿状脳症(例えば、クロイツフェルトーヤコブ病、ゲルストマンーシュトロイスラーシャインカー症候群、クールー、および致死性家族性不眠症)と動物の全ての既知のプリオン脳症の両方に当てはまる(ウェバー(Weber)およびアグジ(Aguzzi), 1997)。後者は、ヒツジのスクレイピー、ウシ海綿状脳症、ならびにラバ、シカ、および外来有蹄類の慢性消耗病を含む(ウェイスマン(Weissmann)およびアグジ, 1997)。

【0003】

しかしながら、伝達性海綿状脳症を引き起こす感染因子として、このように作戦的に特定されたプリオンが中枢神経系および末梢神経系以外の器官に集落形成することができ、脳外区画において証明することができることは間違いない(アグジら, 1997)。器官系が感染力を有する問題は、複数のプリオン株の存在によってさらに複雑になる。従来のウイルスの株と同様に、プリオンには様々な異なる特色があり、これらのそれぞれには感染宿主域に関して特定の好みがあり、プリオンが複製する細胞タイプに関しても特定の好みがある(アグジ, 1998)。血液安全性の問題に直接関連する矛盾した状況の1つが、ウシおよびヒトのBSE因子の根本的に異なる臓器親和性によって例示される。BSEプリオンは大部分が経口暴露後でさえもウシの神経区画に限定されるように見られる(ウェルズ(Wellis)ら, 1998)。感染した脳100グラムを与えた時のウシにおける実験BSEの病理発生の非常に正確な研究によって、感染力を回腸末端部において証明できる期間は短くかつ一時的であることが明らかになっている(ウェルズら, 1998)。もっと後の時点では、BSEプリオンは、脳、脊髄、および後根神経節だけにしか示されない。回腸末端部におけるBSEのはっきりした局在は知られていない。感染力がパイエル板に、または粘膜下神経叢および筋層間神経叢を含む神経区画に存在するかどうかが議論されている。BSEプリオンが、新変異型クロイツフェルトーヤコブ病(nvCJD)を引き起こすことができるという多くの状況証拠があるが(ブルース(Bruce)ら, 1997; チャゾト(Chazot)ら, 1996; ヒル(Hill)ら, 1997; ウィル(Will)ら, 1996)、完全に最終的な証拠は得られていない。以下の議論のために、本発明者らは、BSEおよび新変異型クロイツフェルトーヤコブ病が同じ因子によって引き起こされる証拠を十分に実証されているものとみなす(アグジおよびウェイスマン(Weissmann), 1996)。nvCJDを発現させるためにヒトに継代し、連続的に進行させると、プリオンは臓器親和性の劇的な変化を経験する。プリオンは、

50

主として神経構造に限定されたままにならず、最も顕著には扁桃腺、脾臓、最近証明されたように虫垂を含む、免疫系に属する多くの器官において検出することができる（ヒルトン（Hilton）ら、1998）。従って、様々な構造に対する感染因子の親和性が、問題になっているプリオン株と（従って、ある程度、そのキャリアとは独立している）、プリオン病それ自体が発現する種の両方によって決まると結論を下すことは避けられない（アグジおよびワイズマン（Weissmann）、1998）。

【0004】

これらの考えは学問的な関心事であるだけではない。実際に、医師による操作（すなわち、輸血、臓器移植など）による因子の伝播性は、このようなパラメータの影響を決定的に受ける。

10

【0005】

ヒトプリオンの水平伝播性：

ヒトのプリオン病は間違いなく伝播性である。しかしながら、伝播は特定の状況でのみ達成される。この点で、プリオン病は、産褥熱についてゼンメルワイス（Semmelweis）によって述べられた伝播性の特徴を満たしていると言うことができる。すなわち、これらの病気は感染性であるが、接触伝染性でない。クロイツフェルトーヤコブ病に罹患した患者から他の人間への脳由来材料の直接伝播が疾患伝播をもたらしたことが記録に残っている。特に悲惨な症例が17世紀初期、チューリヒで起こり、この時、クロイツフェルトーヤコブ患者からの皮質記録に用いられた電極が（ホルムアルデヒドおよびアルコール）滅菌され、さらなる患者に用いられた。疾患は非常に若いレシピエントに伝播した（ベルノウリ（Bernoulli）ら、1977）。また、角膜移植が疾患伝播をもたらしたことはほぼ間違いない（ダフィー（Duffy）ら、1974）。

20

【0006】

これらの悲惨な局面にもかかわらず、神経外科手術を介したCJD医原性伝播の症例は相対的に稀なままであった。不顕性CJDの頻度が顕性疾患の頻度よりかなり高くなければならず、プリオンを確実に不活化するように大部分の神経外科機器が滅菌されないことを考えると、このことは完全に理解されていない。従って、医原性伝播の非常に稀な性質は、プリオン毒性に加えて宿主要因が、感染が起こる可能性に影響を及ぼし得ることを示している可能性が高い。この考えは、汚染硬膜伝播の際の医原性CJD（iCJD）の疫学によって強められた。数千人の患者（大部分が日本の患者）が、プリオンに感染された死体硬膜製剤を介してCJD因子に暴露された可能性があるという見積もられている。しかしながら、暴露された患者の2%未満がこれまでに発症しているように見られる。感染力の「結果（take）」のこの低い効率は喜ばしいが、その一方で、CJDプリオンに暴露された大部分の被験者が経験した見かけ上の防御についての生物学的な基礎は完全に理解されていない。医原性伝播に関する最も大きな問題は、死体由来の脳下垂体ホルモンの投与の結果として起こった（ギブス（Gibbs）ら、1985）。ヒトプリオンに汚染された成長ホルモンおよびゴナドトロピンの製剤は、80人を超えるヒト（大部分が子供）の死を招いた。この因子が（例えば、筋肉内注射を介して）脳外部位に導入された時に予想される長い潜伏期間のために、10年以上前に止められたこの処置によるさらなる症例が将来現れると想定しなければならない。

30

40

【0007】

この悲惨なヒトでの局面ならびに患者および医師に犠牲を与えた損害の他に、脳下垂体ホルモンの惨事を詳細に理解する必要がある。なぜなら、脳下垂体前葉は中枢神経系の一部でないからである。従って、これらの事象は、プリオン複製の標準的な部位に属さない汚染脳外組織を介したプリオン伝播の代表例として役立つ可能性がある。脳内汚染後の潜伏期間が末梢感染後の潜伏期間よりかなり短いという観察は様々な動物モデルからの実験データとよく一致し、相当に長い脳外事象段階（因子の複製および特定の神経外系の侵入を含み得る）がプリオン神経侵入の前提条件であり得ることを示唆している（アグジ、1997）。

【0008】

50

プリオンの神経親和性に影響を及ぼす因子：

プリオン感染間の神経侵入工程が非常に厳重に制御されていることを推測するもっともな理由がある。恐らく、これに関する最良の議論は、スクレイピープリオンが腹腔内接種された実験動物の潜伏時間が極端に再現可能であるという観察から出ている。既知量の標準接種物を接種した際の、様々な研究室における経験内容は、接種と最初の臨床症状との間の潜伏期間がおおよそ数パーセントポイントの標準偏差を示すことであった（クライン（Klein）ら，1997）。プリオン神経侵入が完全にランダムな工程であれば、潜伏時間には大きなばらつきが予想され、潜伏時間は偶然によって支配される工程に左右されるであろう。しかしながら、いくつかの律速工程が神経侵入を制御するのであれば、これらは、潜伏時間の著しい正確さの原因である可能性がある。もっとはっきり言ってしまえば、本発明者らはこの解釈が正しいことを強く望んでいる。なぜなら、このような工程が存在すれば、この工程を操作できる可能性があり、その結果として、顕性プリオン病を阻止するための暴露後の戦略になる可能性があるからである。実際に、神経侵入を達成する可能性のある様々な機構が探索されてきた。

【0009】

第一段階すなわち神経侵入は免疫系の広範な集落形成であるように見える。この集落形成は、脾臓、リンパ節、扁桃腺、および虫垂もホモジナイズし、ホモジネートを適切な実験動物に注射することによって視覚化することができる。実験動物の50%が発病するホモジネートの希釈液が、各接種物にID50感染因子を含んでいる。

【0010】

神経侵入の第二段階は、養子骨髄移入によって交換することができず（ブラットラー（Blattler）ら，1997）、末梢神経系および／または二次リンパ器官の胚中心に耐性の濾胞性樹状細胞によって示すことができる区画に依存しているように見える。この第2の区画は、神経侵入を支持するために正常プリオンタンパク質の発現を必要とするように思われる（ブラットラー，1997）。

【0011】

神経侵入は機能的な免疫系に依存しており、免疫不全マウスは中用量の因子を接種した後には疾患を発症しない（フラセル（Fraser）ら，1996；キタモト（Kitamoto）ら，1991；ラスメザス（Lasmezas）ら，1996；オロウルケ（O'Rourke）ら，1994）。神経侵入に必要な免疫系の重要な一成分を追跡して、終末成熟したBリンパ球の物理的存在を突き止めた。現在まで、プリオンを物理的に結合し、プリオンを神経侵入部位に運ぶためにB細胞が必要とされるかどうか、またはB細胞が、神経侵入の促進を間接的に担っている因子を産生するか、もしくは工程を誘導するかどうかは、はっきりしていない（クレイン（Klein）ら，1997）。濾胞性樹状細胞の成熟に必要とされるBリンパ球分泌リンホトキシンの条件、および実験の状況で濾胞性樹状細胞が多量のスクレイピープリオンを蓄積するということを考えると、前記工程におけるBリンパ球の主な機能がFDCの成熟にあると推測することは魅力的である。

【0012】

プリオン神経侵入の細胞的および分子的な基礎：

マウスの末梢部位にプリオンを実験的に接種した後、一般的に、リンパ細網系（LRS）内で長期間で臨床的に無症状の感染因子複製段階がある。これは、プリオンによる検出可能な神経侵入およびその後の神経学的症状の出現の前に起こる。この症状発現前の潜伏期間の間、プリオンは、リンパ細網組織内で高力価になるまで複製することができる。末梢リンパ組織内でプリオンが複製する細胞タイプおよびプリオンが中枢神経系（CNS）に輸送される方法（これは重要である）を解明することは非常に興味深く、臨床的に重要である。末梢プリオン病理発生における免疫系の役割を意味する多数の証拠にもかかわらず、この工程に関与する細胞の正体に関する研究はほとんどなかった。何年も前に、 γ 線によるマウスの全身照射がプリオン病理発生またはスクレイピーの潜伏時間に影響を及ぼさないことが明らかになった。これは、プリオン増殖のリンパ細網段階における増殖細胞のかなりの関与に反対する議論と考えられている。実際に、PrP^{Sc}がスクレイピーに感

染した野生型マウスおよびヌードマウスの濾胞性樹状細胞網において蓄積するので、濾胞性樹状細胞 (FDC) はリンパ組織内でプリオンが複製するための最も重要な細胞タイプと考えられている (キタモト (Kitamoto) ら, 1991)。さらに、成熟したB細胞およびT細胞が無く、機能的FDCを有するように思われない重症複合免疫不全症マウス (SCID) は、腹腔内接種後のスクレイピーに対して非常に耐性があり、脾臓においてプリオンを複製しない (フラセルら, 1996; キタモトら, 1991; ラスメザス (Lasmezas) ら, 1996; オロウルケ (O'Rourke) ら, 1994)。興味深いことに、野生型脾細胞を用いたSCIDマウスの骨髄再構成は、末梢感染後のスクレイピーに対する十分な感受性を回復させる (フラセルら, 1996; クレインら, 1998)。これらの発見は、インタクトな、または少なくとも部分的に機能的な免疫系 (リンパ球およびFDCを含む) が、末梢感染部位からCNSへのプリオンの効率的な移動に必要とされることを示唆している。 10

【0013】

脳内接種または腹腔内接種後のスクレイピー病発症の時間経過は高度に再現可能であり、主として接種物の用量に依存している。従って、末梢リンパ組織から移動するプリオンによる神経侵入は、厳密に制御された律速反応に依存しているのかもしれない。プリオン神経侵入間のこのような律速段階を特定するために、PrPを過剰発現する脳ニューログラフトを有するPrPC欠損マウスを腹腔内 (i. p.) 感染させた。移植片には疾患は観察されず、これは、神経侵入が脳外部位でのPrP発現に依存することを示唆している。これは、リンパ組織における感染力を回復させるが、依然としてプリオンを神経系に運ばないPrPC発現細胞を用いたリンパ系の再構成によってさらに強められた。 20

【0014】

プリオンはリンパ細網組織において検出することができるので、末梢病理発生の理解は、症状発現前症例からの、ことによると汚染された外科用機器からの血液もしくは組織への暴露または血液および血液製剤の暴露を介したヒトBSEの医原性伝播の危険性の評価において非常に重要である。さらに、このような進歩は、感度の高い診断試験およびプリオン神経侵入をブロックするための手段の開発への道を開くかもしれない。プリオンによる血液供給の汚染がなぜ重要な問題であるのか。主な問題は新変異型CJDである。一つの理由としては、この新しい疾患の疫学および医原性伝播性は、散発性CJD (sCJD) と同じくらいに圧倒的に理解されていない。最も心を乱すことには、英国、ことによると他の国における症状発現前疾患の分布がはっきりせず、集められているわずかな情報が樂觀から程遠い (ウィル (Will) ら, 1999)。さらに、nvCJDがその散発性CJDより「リンパ侵入性」であり得ると考えることは道理に合っている。特に、nvCJDプリオンは扁桃腺および虫垂などのリンパ器官において容易に検出することができる (ヒル (Hill) ら, 1999; ヒルら, 1997; ヒルトン (Hilton) ら, 1998)。このことは、スクレイピーに当てはまるが (シュレウダー (Schreuder) ら, 1997; シュレウダーら, 1998; バンケウウレン (Vankeulen) ら, 1996)、sCJDプリオンには当てはまらないことが以前に証明された。入手可能な全ての証拠が、リンパ器官におけるプリオン貯蔵庫として濾胞性樹状細胞を指摘しているが、実験的に接種されたマウスの脾臓リンパ球はプリオンに感染することができる (ラエバー (Raebler) ら, 1999)。循環リンパ球のプリオン感染力は、脾臓リンパ球において検出されるものより少なくとも2対数少ないように見えるが (ラエバー (Raebler) ら, 1999)、循環リンパ球がその脾臓同胞と平衡状態にあり得る可能性は警告措置 (cautionary measure) を要する。後者は、依然として論争および議論を呼ぶところである。すなわち、白血球除去が主張されているが、現在、その効力について確実なものではなく、白血球除去に現在利用可能な技術が、nvCJDから得た血液供給への脅威を少なくするのに必要および/または十分であるかどうかでさえ確実なものはない。さらに、血液プリオン感染力がインビゴでリンパ球に元々含まれていたとしても、細胞溶解が、適切な除去手段の非存在下、安定な血液製剤の非存在下で非粒状画分の汚染につながる可能性があることを考慮に入れなければならない。 50

【0015】

第二の考えが二次予防に適用される。ヒトの食物連鎖に入った非常に多くの感染性BSE材料を考えると、多くの個体が症状発現前nvCJDにかかっている可能性がある。この因子の蔓延を制限するのを助け、願わくば、これらの人間における症状の臨床的大発生を予防するための戦略を開発することは絶対必要であり、急を要する。神経侵入を妨げるための可能性のある標的は、感染個体内でのプリオン複製を制御する律速工程である。前記の知識を考えると、プリオン複製および神経侵入の神経-免疫境界面を標的とした治療（アグジおよびコリング（Collinge），1997）は、暴露後予防を対象とした研究の将来有望な分野のように思われる。

【0016】

10

プリオンを検出するための方法およびその限界：

リアルタイムキネティックポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の時代、本発明者らが血液中のウイルス汚染物質の検出に適合されたアッセイ法から必要とした検出閾値には役立たなかった。HIVの場合を考える。ここで、定量的PCR技術の導入は、血液および血液製剤における検出限界を、ある程度完全なものに押し下げた。PCR技法が有用であると判明しなかった、またはこのような幅広い支持をまだ受けていなかった時でさえ、時間分解蛍光ELISAなどの超高感度免疫化学法が、ほとんどのスクリーニング用途に非常に申し分のない洗練された程度まで進歩していた。そうすると、なぜ、依然として血液中のプリオン検出に関して問題があるのか。

【0017】

20

最も手に余る問題は、プリオンの独特の生物学的性質から生じている。ある程度一般に認められている知識によれば、感染性プリオンは、正常細胞タンパク質PrP^Cと正確に同じアミノ酸構造を有するPrP^{Sc}。タンパク質のみからなっている可能性が高い。このことを言葉で表現する当たり障りのない方法は、PrP^{Sc}がプリオン感染力の唯一知られている代用マーカーであると述べることである。この後者の言い方は、タンパク質のみ（protein-only）仮説の支持者と感染因子がウイルスであると依然として考えている人の両方が賛成する可能性が高い。

【0018】

プリオン検出について前記で述べられた事実の結果は明らかである。プリオンに特異的な核酸が存在しない場合、その核酸を検出するための、どのPCRに基づくスクリーニングアッセイ法も選択肢でない。従って、免疫化学的アッセイ法が残った。これらはまた、PCRより数桁感度が低い上に、一連のプリオンに特有の問題をはらんでいる。最大の問題は、TSE因子の独特の生物学的性質から再度生じている。前記で説明したように、PrP^{Sc}はPrP^Cと同じ化学組成を有し、後者は、健康個体の多くの細胞タイプ（白血球を含む）において通常見出される膜結合タンパク質である（アグジおよびワイスマン（Weissmann），1997）。PrP^CおよびPrP^{Sc}は多くの物理的性質の点で異なるが、これらの2つのアイソフォームを確実に区別する免疫学的試薬を開発することは非常に難しいように見える。PrP^{Sc}と反応するが、PrP^Cとは反応しないモノクローナル抗体は1つしか述べられておらず、その発表の14ヵ月後、追跡調査が現れておらず、この試薬を初めて開発した会社でさえBSEプリオンに対する会社内でのスクリーニングアッセイ法に使用したように見えないので、その実際の有用性は依然として証明されていない。

【0019】

今までで最良のプリオン検出法は、プロテイナーゼK（PK）を用いて消化されたホモジネート脳組織を用いてウエスタンブロット分析を行うことによる方法である。ウエスタンブロット分析のために、細胞プリオン（PrP^C）と病原性プリオン（PrP^{Sc}）との差がこれ以上見出されないように二次構造を破壊するので、消化は必要である。しかしながら、PrP^Cは、特定の条件下でのPKによって容易に消化されるのに対して、PrP^{Sc}は、PrP²⁷⁻³⁰と呼ばれる比較的大きな断片にしか分解されない。

【0020】

50

タンパク質をいわゆる磁気ビーズ (MB) (これには特異的抗体が結合している) に吸着させることによって、タンパク質を濃縮することも既に知られている。しかしながら、このような濃縮方法を PrP に適用することは、プリオンの特殊な性質のために不可能であると考えられていた。

【0021】

従って、疾患を診断するだけでなく、さらに研究もするために、少量の PrP^s。コンフォメーションプリオンを検出するための感度の高い方法または試験、ならびにこのような試験を行うための因子を有する大きな必要性が依然として存在する。

【0022】

発明の簡単な説明

10

従って、本発明の1つの目的は、それぞれ PrP^s。または PrP²⁷⁻³⁰。として病原性プリオンタンパク質を検出する方法を提供することである。

【0023】

本発明の別の目的は、プリオン、特に、PrP^s。と相互作用する物質を探索するための方法を提供することである。

【0024】

本発明のさらに別の目的は、PrP^s。および/または PrP²⁷⁻³⁰。を特異的に認識する物質である。

【0025】

本発明のさらに別の目的は、例えば、このような物質を有する磁気ビーズなどの固相材料 20 およびそれを含む組成物である。

【0026】

本発明のさらに別の目的は、体液の精製ならびに外科用機器および診断機器の滅菌のための、このような物質を含む組成物である。

【0027】

さらに別の目的は、伝達性海綿状脳症 (TSE) を診断するための改善した方法およびそのための手段を提供することである。

【0028】

PrP^s。は「感染タンパク質」とも呼ばれる。PrP^s。は、如何なる TSE 兆候も示さず、発症もしていない健常な生物における PrP^c の「正常な」コンフォメーションと 30 は異なるコンフォメーションを有するプリオンタンパク質を意味する。

【0029】

「PrP^s。と選択的に相互作用するが、PrP^c と相互作用しないプリオン結合部位」とは、PrP^s。に結合することができるが、PrP^c に結合しない分子または分子の一部を意味する。このような結合部位は、例えば、低分子有機化合物、ペプチドまたはタンパク質によって、ならびに抗体の抗原結合部位によって得ることができる。本明細書において、「抗体」という用語は、とりわけ、従来の抗体、scFv 断片 (Fab)、および (Fab)₂ 断片を含む。このような文脈での「選択的に」という用語は、結合部位を有する化合物が、PrP^c コンフォメーションのプリオンタンパク質より、少なくとも2倍、好ましくは少なくとも5倍、好ましくは少なくとも10倍強く PrP^s。コンフォメーションのプリオンタンパク質と相互作用することを意味する。最も好ましくは、結合部位は、プラスミノゲンによって示されるように、少なくとも PrP^s。に対して選択性を示す。 40

【0030】

「プリオン結合活性を有する因子」とは、プリオンタンパク質に結合することができ、本発明の選択的プリオン結合部位を有する化合物を意味する。この因子は低分子化合物でもよいが、好ましくは、少なくとも10アミノ酸長のペプチドまたはタンパク質である。しかしながら、これらのペプチドまたはタンパク質は、炭水化物残基または脂質残基などのさらなる非タンパク質残基を有してもよい。この因子は、例えば、動物またはヒトに由来してもよく、合成したものでよい。

50

【0031】

「プラスミノゲンに含まれる選択的プリオン結合部位」とは、 PrP^{Sc} と選択的に相互作用するが PrP^C と相互作用しない、動物由来またはヒト由来プラスミノゲンに含まれるアミノ酸配列の全てまたは一部を有するペプチドまたはタンパク質によって得られる結合部位を意味する。

【0032】

「プラスミノゲンの誘導体」は、天然に生じるプラスミノゲンまたはその断片と比較して少なくとも1つのアミノ酸付加、置換、または欠失を有するが、依然として、 PrP^{Sc} と選択的に相互作用することができ、 PrP^C と相互作用しないペプチドまたはタンパク質を意味する。このような誘導体は、例えば、天然に生じるプラスミノゲンをコードする 10
核酸の部位特異的変異誘発によって、またはペプチド合成によって容易に調製することができる。

【0033】

「プラスミノゲンの断片」とは、 PrP^{Sc} と選択的に相互作用できるが、 PrP^C と相互作用しない、天然に生じるプラスミノゲンの一部を意味する。

【0034】

「 PrP^{Sc} のカルボキシル末端」とは、プリオンタンパク質のカルボキシル末端からの最初のアミノ酸を意味する。

【0035】

「リガンド」とは、 PrP^{Sc} と本発明による結合因子との複合体に選択的に結合するが 20
、遊離 PrP^{Sc} のみまたは遊離因子のみと相互作用しない化合物を意味する。このようなリガンドは、例えば、抗体でもよく別の受容体型タンパク質でもよい。

【0036】

本発明は、とりわけ、 PrP^{Sc} またはその消化産物を濃縮するための方法に関する。ここで、体液または流動化された器官が、 PrP^{Sc} と選択的に相互作用するが PrP^C と相互作用しないプリオン結合部位を少なくとも部分的に有する固相材料で処理される。ある特定の結合部位の選択性は、本明細書以下でさらに説明するように容易に決定することができる。十分な選択性が、例えば、プラスミノゲンによって示される。

【0037】

このような文脈での「流動化された器官」という用語は、器官に由来し、器官の構成要素 30
のかなりの割合を溶液または懸濁液にするために機械的手順、超音波処理、または他の手順によって可溶化された組織を意味する。

【0038】

さらに好ましい態様において、流動化された器官は、ホモジナイズされた組織（好ましくは中枢神経系組織）、好ましくはホモジナイズされた脳組織である。

【0039】

さらに好ましい方法において、血液、血漿、血清、尿、またはリンパなどの体液が、プロテイナーゼ（好ましくは、プロテイナーゼK（PK））で処理される。さらに好ましい方法において、選択的プリオン結合部位は、プリオン結合活性（ $PrPB$ ）を有する因子に含まれる。このような因子は、好ましくは、ペプチドまたはタンパク質である。ペプチド 40
またはタンパク質の場合、これは、 PrP^{Sc} またはその消化産物への安定な結合を可能にするのに十分な長さである。十分な結合安定性（または親和性）が、例えば、プラスミノゲンによって示される。

【0040】

さらに好ましい方法において、固相材料は、血清または血漿中に見出されるような、好ましくは、血清または血漿の硫安沈殿の画分 I I に含まれるような $PrPB$ を有する。

【0041】

さらに好ましい方法において、固相材料は、プラスミノゲン、フィブリノゲン、または血漿の硫安沈殿の画分 I I に見出される $PrPB$ を有する。

【0042】

さらに好ましい方法において、PrPBは、プラスミノゲン、フィブリノゲン、sPrPBIIおよび、PrPBIIまたはその断片（この断片は完全なタンパク質と同じ選択性を示す）から選択される。

【0043】

本発明は、さらに、PrP^s。またはその消化産物を検出し、選択的に定量するための方法に関する。この方法は、PrP^s。またはその消化産物を前記のようなプリオン結合部位に選択的に結合させる段階を含む。

【0044】

好ましい態様において、プリオン結合部位は、プリオン結合活性を有する因子に含まれる。

【0045】

好ましい態様において、因子は、血清、血漿、血清もしくは血漿の硫安沈殿の画分II、血漿の硫安沈殿の画分Iに含まれる因子、またはプラスミノゲン、フィブリノゲン、sPrPBII、および、PrPBIIまたはその断片（これは完全なタンパク質と同様の選択性を示す）によって得られる因子から選択される。

【0046】

PrP^s。とプリオン結合部位との間で生成された複合体の検出は、このようなタンパク質複合体の検出に現在適用可能な任意の方法によって、例えば、任意のタイプの親和性アッセイ法によって、または特に、例えば、デビット・ワイルド (David Wild) の「イムノアッセイハンドブック (The Immunoassay Handbook)」, 第2版 ISBN 0-33-72306-6, Nature Publishing Groupに記載のようなイムノアッセイ法において行うことができる。高い選択性を達成するために、蛍光検出法が好ましい。

【0047】

さらに、本発明は、PrP^s。またはその消化産物と、PrP^s。と選択的に相互作用するが、PrP^cと相互作用しないプリオン結合部位を有する材料を含む組成物を初めて提供する。好ましい態様によれば、プリオン結合部位は、プリオン結合活性を有する因子（好ましくは、血清、血漿、血清もしくは血漿の硫安沈殿の画分II、血漿の硫安沈殿の画分Iに含まれる因子、またはプラスミノゲン、フィブリノゲン、sPrPBII、および、PrPBIIに含まれる因子から選択される）に含まれる。

【0048】

本発明は、さらに、本発明のプリオン結合部位を有する固相材料を提供する。この結合部位は、好ましくは、プリオン結合活性を有する因子に含まれる。この因子は、好ましくは、血清、血漿、血清もしくは血漿の硫安沈殿の画分II、血漿の硫安沈殿の画分Iに含まれる因子、またはプラスミノゲン、フィブリノゲン、sPrPBII、および、PrPBIIに含まれる因子から選択される。

【0049】

本発明は、さらに、PrP^s。と、PrP^s。と選択的に相互作用するがPrP^cと相互作用しないプリオン結合部位（好ましくは、プラスミノゲンに含まれる選択的PrP^s。結合部位）を有する因子を含むタンパク質複合体を提供する。

【0050】

本発明は、さらに、血液、尿、脳脊髄液、脳組織、リンパ節、扁桃腺などの体液または器官における病原性プリオンタンパク質（例えば、PrP^s。）を検出するための試験キットを提供する。このキットは、本発明によるプリオン結合部位を有する因子を含み、この因子は、好ましくは、血清、血漿、血清もしくは血漿の硫安沈殿の画分II、血漿の硫安沈殿の画分Iに含まれる因子、またはプラスミノゲン、フィブリノゲン、sPrPBII、および、PrPBIIに含まれる因子から選択される。

【0051】

本発明は、さらに、ヒト伝達性ヒト海綿状脳症または動物のプリオン脳症を診断するためのアッセイ法を提供する。このアッセイ法は、試験しようとする試料と、PrP^s。と選

択的に相互作用するがPrP^Cと相互作用しないプリオン結合部位を接触させる段階を含む。好ましい態様において、試料は血液から得られる。試験される動物またはヒトは、PrP^{Sc}が試験試料中に検出された場合、陽性（すなわち、伝達性海綿状脳症を発症する現行の危険性が陽性）と診断される。

【0052】

本発明は、本発明による選択的プリオン結合部位を含む、PrP^Cに対する結合因子を使用することによって、正常PrP^Cも含む可能性がある試料におけるPrP^{Sc}の検出を初めて可能にする。

【0053】

本発明のさらなる局面において、PrP^{Sc}のカルボキシル末端部分は選択的結合部位の標的である。驚くべきことに、PrP^{Sc}のカルボキシル末端は、PrP^{Sc}とPrP^Cとの区別を可能にする結合部位をもたらすことが発見された。この結合部位は、本発明による結合部位の好ましい標的である。

【0054】

さらに驚くべきことに、異なる種に由来するプリオンタンパク質間に配列変化が存在することが知られているが、本発明による結合部位は異なる種のPrP^{Sc}とPrP^Cを強力に区別することが見出された。従って、本発明による1つのプリオン結合部位を用いることで、異なる種のPrP^{Sc}を検出することができる。非常に好ましい結合部位は、ヒトプラスミノゲンに含まれる結合部位である。驚くべきことに、プラスミノゲン結合部位は、複数の種に由来する疾患関連プリオンタンパク質と相互作用することが見出された。本発明によるこの発見は、さらに、個々のPrP^{Sc}分子の特定のタンパク質構造に特有の特性ではなく様々な種のPrP^{Sc}に共通する性質が、プラスミノゲンにおける結合部位への結合を担っていることを示唆している。

【0055】

本発明による使用のための担体として、生物学的試料中のある特定の化合物を検出するための生物学的アッセイ法を行うのに現在適用可能な本質的に全ての材料を考慮に入れることができる。このような担体として、磁気ビーズ、フィルター細片、マイクロタイタープレートの壁が挙げられる。

【0056】

本発明の1つの局面によれば、PrP^{Sc}の検出は、まず最初に、PrP^{Sc}と本発明による結合部位との間で複合体が形成され、次いで、このように形成された複合体がリガンド（例えば、抗体）によって選択的に検出される点で「間接的に」行うことができる。PrP^{Sc}とその結合因子との相互作用によって形成されたエピトープと選択的に相互作用する、このようなリガンドもまた高度に選択的であり、このような複合体だけを検出するが、遊離PrP^{Sc}も本発明による遊離因子も検出しない。

【0057】

本発明による生成物は、PrP^{Sc}を検出するためにアッセイ法を行うための全ての成分を含む新たな診断キットを提供するのに有用である。このようなキットは、本発明による生成物に加えて、緩衝液、試料中のPrP^{Sc}の存在の結果である生成物を検出するための試薬、アッセイ法を確実にを行う方法に関する作業説明書を含んでもよい。

【0058】

PrP^{Sc}それ自体はTSEの発症において必須の要素であるので、遊離PrP^{Sc}を利用しにくくすることは、BSE発症を回避するのに、および／またはBSE発症の速度を遅らせるのに有用な手段であるかもしれない。遊離PrP^{Sc}を減らすための手段は、本発明による結合部位へのPrP^{Sc}の結合である。従って、この結合部位は、薬学的組成物の一部をなすことができる。

【0059】

または、本発明による結合部位は、例えば、透析の形で、生物学的細菌からPrP^{Sc}を除去するために使用することができる。ここで、試験しようとする動物の血液を、本発明の結合部位を含む担体と連続的に接触させる。

【0060】

従って、本発明は、ヒト伝達性海綿状脳症および動物のプリオン脳症を診断するための信頼性の高い方法を始めて可能にする。この方法では、試験しようとする動物の材料を本発明の結合部位と接触させる。

【0061】

PrP^s。またはその消化産物を濃縮するための本発明の好ましい方法において、例えば、血液、尿、脳脊髄液などの体液、または脳組織、リンパ節、扁桃腺などの流動化された器官が、磁気ビーズ (MB) などの固相材料で処理される。ここで、材料またはビーズそれぞれの少なくとも一部はプリオン結合部位を有する。好ましいプリオン結合部位は、プリオン結合活性 (PrPB) を有する因子である。

10

【0062】

前記の方法は、流動化された器官、特に、ホモジナイズされた中枢神経系組織、好ましくは、ホモジナイズされた脳組織を用いて非常にうまくいく。

【0063】

プリオン結合部位が消化された形のPrP^cとPrP^s。しか区別できない場合、実際の濃縮段階前に、体液または流動化された器官を消化することが必要である。適切な消化はプロテイナーゼK (PK) を用いた消化によって得られる。ここで、固相 (例えば、MB) の添加前にプロテイナーゼKを不活化することが重要である。

【0064】

しかしながら、PrP^s。に対する選択性を得るために出発材料の消化を必要としない方法が好ましい。

20

【0065】

PrPBを有する好ましい固相材料は、このような材料と血清または血漿 (例えば、哺乳動物の新鮮な凍結血漿) をカップリングすることによって調製することができる。ここで、過剰なタンパク質がカップリング手順の間に存在する。このような因子は、spPrPB (s = 血清および p = 血漿) (以下を参照のこと) と呼ばれる。さらにより好ましい、PrPBを有する固体材料は、精製されたプラスミノゲンもしくはフィブリノゲンまたはその断片を固相 (例えば、ビーズ) にカップリングすることによって調製される (以下を参照のこと)。

【0066】

非常に適した固体材料は磁気ビーズである。なぜなら、磁気ビーズは、対象となる特定の成分で容易に処理することができ、磁場を加えることで容易に収集することができるからである。

30

【0067】

本発明のさらに好ましい方法は、PrP^s。またはその消化産物の検出 (任意で、定量) に関する。ここで、まず最初に、PrP^s。は前記のように濃縮され (任意で、体液または流動化された器官を前もって消化することも行われ)、次いで、検出され、任意で標準と比較される。適切な検出法はウエスタンブロット分析である。このような試験は、さらに、マイクロタイタープレートフォーマットイムノアッセイ法 (例えば、ELISAアッセイ法)、免疫沈降アッセイ法、BIACOREアッセイ法、免疫細胞化学アッセイ法、ヒストプロットアッセイ法などの他の検出法によって具体化されてもよい。

40

【0068】

前記方法に加えて、本発明はまた、プリオン結合活性を有する因子 (例えば、血清の硫安沈殿の画分IIにあるプリオン結合活性であるsPrPBII、または正常もしくは新鮮な凍結血漿の硫安沈殿の画分IIにあるプリオン結合活性を有する因子であるpPrPBII) に関する。これらの因子は、もちろん、どのような形態 (例えば、単離された形態または組成物 (例えば、硫安沈殿画分) 中の成分として) でも本発明の主題である。

【0069】

前記の因子はPrPBの濃縮および/または単離によって得ることができる。ここで、血清または血漿は、対象となるPrPBが好ましくは一画分のみに沈殿するように分画硫安

50

沈殿にかけられる。さらなるタンパク質単離法の適用によって、さらなる精製を得ることができる。

【0070】

本発明の因子はプリオン、特に、 PrP^{Sc} の検出に適するだけでなく、病原性プリオンタンパク質に対する PrP^B の親和性に基づいて、血液、尿、脳脊髄液、脳組織、リンパ節、扁桃腺などの体液および器官から病原性プリオンタンパク質を精製および除去するための方法、または外科用ツールおよび／もしくは診断用ツールを滅菌するための方法においてさらなる用途を有する。これらは、さらに、体内のプリオンの蔓延を妨げるための、 PrP^B 産生の調節に基づいた治療レジメのためのツールである。これに関してプラスミノゲンが特に適しており、プラスミノゲンは、体液（例えば、血液ユニット (blood unit)）の精製にも特に適している。このような精製は、例えば、体液を PrP^B Ip（特に、固定化されたプラスミノゲンまたはそれを含む血漿画分）で処理することによって行ってもよい。

【0071】

本発明の一部はまた、血液、尿、脳脊髄液、脳組織、リンパ節、扁桃腺などの体液または器官における病原性プリオンタンパク質（例えば、 PrP^{Sc} ）を検出するための試験であり、この試験は、病原性プリオンタンパク質への PrP^B の特異的な結合性質を利用している。このような試験は、マイクロタイタープレートフォーマットイムノアッセイ法（例えば、ELISA アッセイ法）、免疫沈降アッセイ法、BIACORE アッセイ法、免疫細胞化学アッセイ法、ヒストプロットアッセイ法などとして具体化することができる。

【0072】

PrP^B 生合成に特有の DNA 配列ならびに適切な宿主においてこのような DNA 配列を発現することができるベクターも本発明に含まれる。

【0073】

さらに、本発明は、ベイトとして PrP^{27-30} を用いて PrP^B を精製するための方法；マウス、ウサギ、ニワトリなどの動物において産生された、 PrP^B に対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体；組換えファージまたは他の組換え系で産生された、 PrP^B に対する単鎖 Fv 断片および他のタイプの抗体断片； PrP^B の多型または PrP^B 産生の強さおよびパターンの変化に基づいてプリオン病に対する感受性を予測する試験；プリオンのバイオアッセイ法において用いられるトランスジェニック動物（例えば、脳、リンパ節、または他の器官において PrP^B を過剰産生するマウス）；プリオンのバイオアッセイ法において用いられるノックアウト動物（特に、 PrP^B が無いマウス）；適切な宿主細胞（例えば、細菌、酵母、菌類、もしくは真核細胞）において PrP^B 生合成に特有の DNA 配列を発現させることによる、および前記生物から PrP^B を精製することによる PrP^B の産生方法；ヒトおよび動物における治療用途のための医薬品としての天然または合成の（好ましくは、精製された） PrP^B の使用；天然または合成の PrP^B （特に、プラスミノゲン）を用いた生物のワクチン接種； PrP^B の異常な産生および／または代謝から生じたヒトおよび／または動物の疾患についての診断アッセイ法を含む。

【0074】

発明の詳細な説明

既に前述したように、伝達性海綿状脳症 (TSE) の診断試験として使用することができる低濃度 PrP^{Sc} の検出法が大いに必要とされている。

【0075】

TSE について基本的に 3 つの診断原理がある：CNS における一般的な海綿状変化の組織病理学的検出、プリオンタンパク質のスクレイピー特異的アイソフォームの検出、および感染力を検出するバイオアッセイ法。これらの全ての方法には限界がある。すなわち、組織病理学は、構造変化が潜伏期の後期に現れるので前臨床診断に有用でない。プリオンタンパク質のスクレイピー特異的アイソフォームの検出はより感度が高いが、バイオアッセイ法よりかなり感度が低い。バイオアッセイ法は、原理上は、1 感染単位という低さで

検出することができるが、数ヶ月または数年も待つことがある。

【0076】

今まで用いられたウエスタンブロット法は、 PrP^{C} と PrP^{Sc} との区別を可能にする PrP^{Sc} の部分的なプロテアーゼ耐性に基づいている。プロテアーゼ処理後、 PrP^{Sc} のプロテアーゼ耐性コアである PrP^{27-30} を検出することができるが、完全に消化された PrP^{C} を検出することができない。

【0077】

プリオンの「粘着性」のために、一般的に、イムノアフィニティ精製 (IAP) は適用できないと思われていたが、今や、プリオン結合部位 (好ましくは、プリオンタンパク質結合活性 (PrPB) を有する因子) を有する磁気ビーズ (MB) を適用することで濃縮を達成できることが見出されている。 10

【0078】

従って、絶対量の PrP^{27-30} の検出感度は抗体親和性の関数であり、本発明の範囲内で、ある特定の各抗体について容易に高めることができないので、今までに考えられた問題にもかかわらず、固相材料 (例えば、磁気ビーズ) に共有結合によって架橋された抗体を用いて「イムノアフィニティ精製」 (IAP) アッセイ法が初めて開発された。IAPの開発のために初め使用されたモノクローナル抗体 (プリオニクス (Prionics), Zurich, Switzerland で購入した 6H4, コース (Korth) ら, 1997 に記載) は PrP^{C} と PrP^{Sc} を区別することができないので (6H4 は未消化形態および消化された PrP^{Sc} (すなわち、 PrP^{27-30}) の両方に結合する)、IAP (図1を参照のこと) 前にプロテイナーゼK消化を行うことが必要である。 20

【0079】

本発明のIAP法の開発のために、以下のモデル系を使用した。この方法の効率を確かめるために、2種類の試験を行った。一方では、少量のスクレイピー感染マウスの脳ホモジネートを水で希釈し、次いで、 PrP^{Sc} 濃縮法に供した。他方では、実際の状況をシミュレートするために、少量のスクレイピー感染脳ホモジネートを非感染マウスの脳ホモジネートで希釈した (実際の状況では、脳ホモジネートは少量の PrP^{Sc} を含んでいる) (図2を参照のこと)。

【0080】

図2において、レーン1~6および10は通常のウエスタンブロットを示し、レーン7~ 30
9および11~13はイムノアフィニティ精製 (IAP) を示す。 $\text{PrnP}\%$ は、 PrP 欠損マウスに由来する材料である。MBは、もちろんIAPだけに用いられ、ここで、6H4は、6H4抗体とカップリングされたMBを指し、-は、カップリングされていないMBを指す。 PrP^{C} は非感染マウスの脳ホモジネートを指し、 PrP^{Sc} はスクレイピー感染マウスの脳ホモジネートを指す。PKはプロテイナーゼK消化を指し、ここで、-は未消化を指し、+は消化されたホモジネートを指す。同じ略語が以下の図に用いられる。

【0081】

ホモジネート (特に、脳組織のホモジネート) におけるプリオン分析のために、最初のホモジネーション段階において、低濃度のイオン界面活性剤を使用し、その後、低速遠心分離 (好ましくは、500g、30分、4℃を2回適用) を行うことが重要である。後の段階のために、高濃度の非イオン界面活性剤を使用し、ホモジネートのタンパク質濃度は多くて5mg/mlである。 40

【0082】

プロテイナーゼK消化のための条件は、好ましくは、50 μ g/mlのPK、37℃、少なくとも30分である。

【0083】

ビーズとホモジネートとの適切なインキュベーション条件は、例えば、室温で約1.5時間である。低濃度の場合、それより長いインキュベーション時間が好ましいことがある。

【0084】

最初の試みでの濃縮段階は、消化されたホモジネートに6H4を有する磁気ビーズ(MB)を添加することで行われた。

【0085】

消化段階が必要な場合、濃縮段階前に行わなければならない。ここで、消化(通常、プロテイナーゼKによる消化)は、例えば、フェニルメチルスルホニルフッ化物または当業者に周知の別の薬剤を用いてプロテイナーゼを不活化することで濃縮段階前に止めなければならない。

【0086】

例えば、脳組織ホモジネートに本発明の方法を適用することで、今まで知られている試験に必要とされる量より非常にわずかしかな病原性プリオンタンパク質を含まない組織から、ウエスタンブロット分析によって検出可能な量まで、PrP²⁷⁻³⁰を濃縮することができる。

【0087】

主として同じ手順を用いて、例えば、PrP^Sの結合パートナーを発見するために、モノクローナル抗体6H4を、調べようとする他の物質に換えることで、前記の方法をプリオン親和性アッセイ法(PAA)として適用することもできる(図3を参照のこと)。

【0088】

このアッセイ法の陽性対照として、6H4(図4、レーン1-3を参照のこと)が用いられ、陰性対照として、マウスIgGまたはマウスアルブミン(図4、レーン4-9を参照のこと)が用いられる。

【0089】

ある特定のマウス血清が、PrP^Sを特異的に認識するIgGを含むかどうかを調べるために、ダイナル(DYNAL)社によってマウスIgGに対するヒツジ抗体で既にコーティングされている磁気ビーズを、マウス血清とのブレインキュベーション後に使用した。ブレインキュベーションなしで使用したこれらのビーズは、第1の陰性対照であった(図5、レーン1-2を参照のこと)。第2の陰性対照として、正常マウス血清からのIgGがPrPのどの形態にも結合しないことを示すために、正常マウス血清とブレインキュベーションした、これらのビーズを使用した(図5、レーン3-4を参照のこと)。驚くべきことに、ビーズのみではPrP^Sに対する親和性を示したが、PrP²⁷⁻³⁰に対する親和性を示さなかった。正常マウス血清とブレインキュベーションすると、PrP²⁷⁻³⁰も結合した。従って、ダイナルからのヒツジ抗体は、PrP^Sに関連しているが、PK処理後に消化された分子を認識すると仮説を立てた。正常マウス血清とブレインキュベーションするとPrP²⁷⁻³⁰が結合するので、この血清は、PrP^Sに対して親和性を有する分子を含んでいる可能性がある。

【0090】

総マウス血清タンパク質にカップリングされたビーズは、PrPのどの形態に対しても親和性を示さなかった。しかしながら、総血清のカップリングが過剰タンパク質の存在下で行われた場合、ビーズは、モノクローナル抗体6H4と同じ、PrP²⁷⁻³⁰に対する結合を示したが(図6、レーン4-6を参照のこと)、過剰のアルブミンの存在下でカップリングされたビーズは、依然として、PrPのどの形態に対しても親和性を示さなかった(図6、レーン1-3を参照のこと)。2つの条件のカップリング効率の差を測定することはできなかったが、過剰タンパク質の提供が、PrP²⁷⁻³⁰に結合するビーズの表面上にスポンジ(sponge)を引き起こしたのかもしれない。本発明者らまた、PK処理された総脳ホモジネートが存在する時にPrP²⁷⁻³⁰が結合した場合のように、PK処理された脳ホモジネートが結合を促進し得るかどうかを調べた。野生型C57BL/6マウスまたはPrnp⁰マウスからのPKで消化された脳ホモジネートの添加が、PrP²⁷⁻³⁰に加えてPrP^Sの結合を可能にした(図7、レーン1-3を参照のこと)。不活性PKの添加は結合活性に影響を及ぼさなかった(図7、レーン7-9を参照のこと)。過剰量の存在下でカップリングした場合、PrP²⁷⁻³⁰を結合する活性は、ヒト、ヒツジ、ウシの血清中に、および末期スクレイビー罹患C57BL/6マウス

の血清中にも見出された（データ示さず）。

【0091】

いくつかの種の血清は、人為構造の他に、プリオンタンパク質の病原性アイソフォームと特異的に相互作用し、ビーズへの結合に速度論的に好ましい活性（総称して PrP^B と呼ぶ）を含むだろう。罹患マウスに存在する天然の PrP^S が、タンパク質分解消化の際に放出され得る PrP^B で飽和しているとする、 PrP^{27-30} に対する親和性を理解することができる。または、部分的なタンパク質分解が、 PrP^S 上に PrP^B 結合部位を暴露するのかもしれない。しかしながら、PKで処理された脳ホモジネートの添加が PrP^S の結合を可能にすることは、本発明者らの観察につながる、いくつかの異なる相互作用がある可能性があることを示している。

10

【0092】

テンプレート指向性リフォールディング仮説によって、 PrP^C および PrP^S が変換工程間にヘテロ2量体を形成することが予測される。従って、本発明者らは、 PrP^B が PrP^C と同一であるかどうかを調べた。しかしながら、過剰量でカップリングした場合、 PrP^B 活性は、野生型マウスの血清と同様のレベルで $Prnp$ %マウスの血清中に存在した。このことは、 PrP^C が結合活性に寄与しないことを意味している（図8を参照のこと）。

【0093】

PrP^B 活性が特別なカップリング条件のみで引き起こされないのであれば、ディファレンシャル硫酸沈殿（*differential ammonium sulfate precipitation*）によるマウス血清の分画によって、 PrP^B 活性を「精製」することが可能なのである。実際に、50%より低い硫酸飽和で PrP^B を沈殿させることが可能であった。ここで、各画分のカップリングは過剰タンパク質の存在下で行われた（図9を参照のこと）。総マウス血清に対する精製されたウサギ免疫グロブリンは PrP^B を含まないが（データ示さず）、総マウス血清（図10、レーン1-3を参照のこと）または25%~50%硫酸飽和で沈殿したタンパク質（図10、レーン4-6を参照のこと）とプレインキュベーションすると PrP^{27-30} を効率的に結合した。75%~100%硫酸飽和で沈殿したタンパク質とのプレインキュベーションは PrP^B 活性につながらなかった（図10、レーン7-9を参照のこと）。この発見は、 PrP^B 活性がビーズ表面との共有結合架橋とは無関係の、1つまたはそれ以上の血清タンパク質の性質であることを示すので重要である。

30

【0094】

硫酸分画はヒト血清を用いても可能であったことから（データ示さず）、ヒト血漿の58の画分をクロマトグラフィーおよびディファレンシャル沈殿によって得て、 PrP^B の正体の考えをまとめるため結合活性について試験した。全ての画分では過剰タンパク質の存在下でカップリングしなかった。従って、結果は、6H4またはマウスIgGと直接比較することができる。20の画分：プラスミノゲン、フィブリノゲン、抗トロンビンIII、抗トロンビンIIIヘパリン複合体、C1エラスターゼ阻害剤、第IX因子、およびタンパク質混合物を含むいくつかの画分の結果が陽性であった（図11を参照のこと）。精製されたプラスミノゲンは PrP^{27-30} に加えて PrP^S を結合し、精製されたフィブリノゲンも同様であった（図12を参照のこと）。結果が陰性であった38の画分のうち、6つが精製タンパク質：プロトロンビン複合体濃縮物、アルブミン、活性化プロトロンビン複合体濃縮物、第XIII因子、およびトロンピンを含んでいた。

40

【0095】

前記のように、 PrP^{27-30} の結合が異なる作用によって引き起こされるという、いくつかの示唆がある。 PrP^{27-30} を結合する活性は、血清および血漿に存在するので $spPrP^B$ （s=血清およびp=血漿）と呼ばれる。この活性は、プラスミノゲンおよびフィブリノゲンで見出された活性と共通点がある。プラスミノゲンおよびフィブリノゲンは両方とも PrP^S も結合するとさらに特徴付けられた。

【0096】

50

カルシウムは凝固カスケードにおける重要な補因子であるので、カルシウム複合体を形成することによって凝固が阻害された場合に、PrP^B 活性が完全なままであるかどうかを調べた。10 mM EDTA の存在下で、プラスミノゲンには病原性PrP^S およびPrP²⁷⁻³⁰ が依然として結合したが（図13，レーン1-3を参照のこと）、フィブリノゲンにはPrP²⁷⁻³⁰ のみが結合した（図13，レーン4-6を参照のこと）。少なくともプラスミノゲンの場合では、この発見は、PrP^B 活性が非特異的凝固によるものである可能性を否定している。PrP^B は病原性PrPと選択的に相互作用するが、PrP^C と相互作用しないので、相互作用はコンフォメーション特異的であるかもしれない。アッセイ法が6 M尿素の存在下で行われた時に、精製プラスミノゲンを含む画分はPrP^S もPrP²⁷⁻³⁰ も結合しなかった（図14，レーン8-9を参照のこと）。これらの条件下では、PrP^S はプロテアーゼ感受性になっている（図14，レーン14-15を参照のこと）。PrP^S のコンフォメーションはPK耐性を担っていると考えられているので、本発明者らは、この実験から、プラスミノゲンとPrP^S との相互作用がコンフォメーション依存的であると結論を下している。

【0097】

さらに、プラスミノゲンのPrP^B 活性は、プラスミノゲンに対する抗体でコーティングされ、プラスミノゲンとブレインキュベートされた磁気ビーズを使用することによって、ビーズへの共有結合架橋に依存しないことが明らかになった（図15，レーン3-4を参照のこと）。2つの陰性対照がある。1. プラスミノゲンに対する抗体でコーティングされたビーズを全くブレインキュベーションしない場合（図15，レーン1-2を参照のこと）、またはアルブミンとブレインキュベーションした場合（図15，レーン5-6を参照のこと）、PrPの病原性アイソフォームは結合しない。2. アルブミンでコーティングされたビーズをプラスミノゲンとブレインキュベーションした場合、これもPrPの病原性アイソフォームへの結合はない（図15，レーン7-8を参照のこと）。

【0098】

さらに、少なくともspPrP^B は病原性PrPを結合するだけでなく、感染力を結合することも分かった。このために、本発明者らは、ビーズの99%を溶出し、ウエスタンブロットを行う前に、指標tg a20マウスに常磁気ビーズの0.2%を皮内接種した（図16を参照のこと）。病原性PrPを結合したビーズが接種された動物は全て疾患を発症した（図17，レーン4、5、および7を参照のこと）。

【0099】

プラスミノゲンと疾患関連プリオンタンパク質との相互作用が海綿状脳症の普遍的な特徴であるかどうかも確かめられた。ヒトプラスミノゲン（100 μg）を、トシル活性化された常磁性Dynabeads M-280（ダイナル，Oslo，1 ml）に結合させた。健常マウス（図18，レーン1）、スクレイピー罹患マウス（レーン2-3）、スイス非罹患ウシのブールされていた脳（レーン4）、および様々な品種のBSE罹患ウシの脳（レーン5-10）からの脳組織を記載のようにホモジネートし、PrP^S の存在について試験した。このために、50 μg（マウス）または1 mg（ウシ）のホモジネートを、抗PrPモノクローナル抗体6H4（データ示さず）、BSA（陰性対照；データ示さず）、またはプラスミノゲンとカップリングされた常磁気ビーズとインキュベートした。ビーズ溶出液（24 μl）をSDS-PAGE（5%濃縮用ゲル-12%分離用ゲル）上で移動させ、ニトロセルロース膜（シュレイチャーアンドシュエル（Schleicher & Schuell），Dassel）上にブロットした。疾患関連PrPを検出するために、膜を、一次抗体として6H4（プリオニクス，Zurich）と、二次抗体としてウサギα-マウスIgG₁-HRP（ザイメッド（Zymed），San Francisco）とインキュベートした。次いで、膜をECL検出試薬を用いて発色させた。シグナルをフィルムに記録し、および/またはKodak ImageStationを用いて定量した。全ての場合で、磁気ビーズに固定化されたプラスミノゲンは、沈殿アッセイ法にかけられた時に各種からのPrP^S を捕獲した。スクレイピーに対する様々なヒッジ品種の感受性にばらつきがあることが報告されている。感受性は、ヒッジPrnp

遺伝子内のコドン136、154、171での多型に位置づけられている。これらの多型はタンパク質のカルボキシル末端で生じ、塩基性アミノ酸に影響を及ぼし、間接的な証拠が、PrP^{Sc}のカルボキシル末端がプラスミノゲンへの結合に関与し得ることを示唆している。本発明者らは、ヒツジにおけるスクレイピーに対する遺伝的感受性が、PrP^{Sc}がプラスミノゲンに結合する能力と相関し得るかどうかを調べた。コドン136、154、171でVHQ/ARQ(図18, レーン11-13)、VRQ/ARQ(レーン14-16)、およびVRQ/ARR(レーン17-19)のPrnp遺伝型を有する非罹患ヒツジおよびスクレイピー罹患ヒツジからの脳組織をホモジナイズし、プリオン親和性アッセイ法にかけた。プラスミノゲンは、調べられた全てのヒツジ遺伝子型からのPrP^{Sc}を沈殿させた。図18は、脳ホモジネートとインキュベートされたプラスミノゲンビーズからの溶出液がウエスタンブロット分析にかけられたことを示す。種および品種を各レーンの上に示す。スクレイピー感染またはBSE感染およびプロテイナーゼKによる試料の消化を「+」および「-」の印で示す。各レーンの下に示した数字は、様々な品種およびPrnp遺伝子型の個々のウシおよびヒツジを示す。プラスミノゲンビーズは、試験した全ての試料においてPrP^{Sc}を固定した。

【0100】

さらに、本発明者らは、プリオン親和性アッセイ法を用いて、散發性クロイツフェルトーヤコブ病、アルツハイマー病(図19)、およびビンズヴァンガー病(データ示さず)で死亡した数人の患者からの脳組織(500 μ g)を試験した。CJD患者のホモジネートを用いて行った全てのアッセイ法において、プラスミノゲンはPrP^{Sc}を沈殿できたのに対して、非CJD患者のホモジネートではシグナルを検出することができなかった。PrP沈着の斑様の斑-周囲空胞(patchy-perivacuolar)パターンおよびシナプスパターンを有する症例から、明白な陽性シグナルが得られた。沈殿アッセイ法におけるPrP^{CJD}シグナルの強度は組織病理学的所見と密接に関連していた(図19)。図19において、プラスミノゲンは、PrP^{CJD}の広範囲の斑様蓄積(a)またはわずかなシナプス蓄積(b, c)を示す3人のスイス人sCJD患者(a, b, c)の脳ホモジネートからPrP^{CJD}を沈殿させた。対照のために、本発明者らは、アルツハイマー病に罹患した患者(d)からの脳ホモジネートを使用した。プロテイナーゼK消化は、対応するレーンの上に「+」の印で示したように行った。PrPに対する抗体3F4(リチャード・カスクサク(Richard Kascsak)博士から入手した、アルバート・アインシュタイン大学(Albert Einstein College), The Bronx, New York, USA or Draco, Denmark, Botrup)で免疫染色された対応する脳切片を右側に示す。いずれの場合でも、プラスミノゲンに基づくアッセイ法およびウエスタンブロットは一致した結果を示す。アルツハイマー病では、PrP^Cは検出できたが(-)、PrP^{Sc}は検出できなかった(+)。スケールバーは50 μ mである。

【0101】

実施例：

実施例1：IAP法

IAPプロトコルは以下である。脳組織を15mlファルコン(FALCON)チューブに入れ、チューブを氷上に置き、全ての段階について氷上に放置しておく。10%(w/v)ホモジネートを得るために、ホモジネート緩衝液(PBSに溶解した0.5%DOC/0.5%NP-40)を添加する。組織を18ゲージ針および22ゲージ針に、それぞれ15分間吸い込んだり吸い出したりすることで通過させる。ホモジネートを4℃で30分間、500gで遠心分離する。上清を保存する。タンパク質濃度を決定する。ホモジネートを4℃で30分間、500gで遠心分離する。上清を保存する。タンパク質濃度が10mg/mlより高ければ、ホモジネート緩衝液を用いて、ホモジネートのタンパク質濃度を10mg/mlにする。ホモジネートのタンパク質濃度を5mg/mlにし、3%Tween 20/3%NP-40を全てPBSに溶解する。組織ホモジネートにプロテイナーゼKを、50 μ g/mlの最終濃度になるように添加する。37℃で60分間イン

キュベートする。5 mMの最終濃度を得るためにPMSFを添加する。0.25体積のIAP緩衝液(PBSに溶解した3%Tween 20/3%NP-40)を添加する。以下に記載のプロトコールによる磁気ビーズ(6H4でコーティングされている)を完全に再懸濁する。100 μ lをピペットで出す。緩衝液を除去する。ホモジネートをビーズに添加し、室温で1.5時間、連続混合しながらビーズ-試料混合物をインキュベートする。MPC(強力磁石)を用いてビーズを集める。室温で15秒ボルテックスし、MPCを用いることで、1mlの洗浄緩衝液(PBSに溶解した2%Tween 20/2%NP-40)で3回、1mlのPBSで1回洗浄する。ビーズを沈降させ、再度MPCを用いて残りの上清を捨てる。24 μ l \times ローディング緩衝液(50 mM Tris (pH 6.8); 2% SDS; 0.01% ブロモフェノールブルー; 10% グリセロール)を添加する。10
5分間95 $^{\circ}$ Cに加熱する。試料を-20 $^{\circ}$ Cで保存したら、SDS-PAGE、その後のウェスタンブロットを行う前に、再度95 $^{\circ}$ Cで30秒間加熱する。ガラスプレートを製造業者の説明書に従って組み立てる。ファルコンチューブ中に適量の分離用ゲル(H_2O 2.1 ml, 40% アクリルアミド 1.5 ml, 1.5 M Tris (pH 8.8) 1.3 ml, 10% SDS 50 μ l, 10% 過硫酸アンモニウム 50 μ l, TEMED 2 μ l)を調製する。示した順番で成分を混合する。TEMEDを添加するとすぐに重合が始まる。アクリルアミド溶液をガラスプレート間の隙間に注ぐ。濃縮用ゲルのために十分な空間を残す(コームの長さ+1 cm)。パストールピペットを用いて、水と一緒にアクリルアミドを注意深く重層する。ゲルを室温で垂直に置く。重合が完了した後(30分)、重層したものを除去し、重合しなかったアクリルアミドを除去するために、ゲルの上部を脱イオン水で数回洗浄する。ファルコンチューブ中に適量の濃縮用ゲル(H_2O 1.48 ml, 40% アクリルアミド 0.25 ml, 1.0 M Tris (pH 6.8) 0.25 ml, 10% SDS 20 μ l, 10% 過硫酸アンモニウム 20 μ l, TEMED 2 μ l)を調製する。示した順番で成分を混合する。TEMEDを添加するとすぐに重合が始まる。濃縮用ゲル溶液を重合した分離用ゲルの表面に直接注ぐ。気泡を閉じ込めないように注意しながら、すぐに、清潔なテフロンコームを濃縮用ゲル溶液に挿入する。ゲルを室温で垂直に置く。重合が完了した後(30分)、テフロンコームを注意深く取り除く。ゲルを電気泳動装置に取り付ける。ランニング緩衝液を上部リザーバおよび下部リザーバに添加する。ゲル底部、ガラスプレート間に閉じ込められた気泡(25 mM Tris, 25 mM グリシン, 0.1% SDS)を取り除く。各試料24 μ lを予め決められた順番で30
ウェル底部にロードする(1. ウェル: 低分子量マーカー)。等量の1 \times ゲルローディング緩衝液を、使われていない任意のウェルにロードする。電気泳動装置を電源に取り付ける(陽極を下部リザーバに接続しなければならない)。10 V/cmをゲルに印加する。染料の先端が分離用ゲルに移動した後(30分)、電圧を14 V/cmに上げ、ブロモフェノールブルーが分離用ゲルの底部に達するまでゲルに電圧を印加する(1時間)。次いで、電源を切る。6枚の吸い取り紙(ワットマン(Whatman) 3MMまたは同等品)および1枚のニトロセルロースをゲルの大きさ(6 cm \times 8 cm)に切断する。紙がゲルの端に重なっている場合、電流が転写装置を短絡させ、ゲルを飛び越え、これによって効率的な転写が妨げられる。吸い取り紙、ニトロセルロース、およびゲルを、転写緩衝液(39 mM グリシン, 48 mM Tris, 0.037% SDS, 20% メタノール)に40
浸けることで湿らす。装置の底板(陽極)の上に、下記の順番で、ゲル、ニトロセルロース、および紙を組み立てる。

下部電極、

転写緩衝液に浸けた3層の吸い取り紙、

転写緩衝液に浸けた1枚のニトロセルロース膜、

転写緩衝液でわずかに湿らしたポリアクリルアミドゲル、

転写緩衝液に浸けた3層の吸い取り紙。

【0102】

気泡を注意深く調べ、手袋をはめた手を用いるか、サンドイッチしたものの周りでピペットを左右に動かすことで気泡を穏やかに除去する。ゲルと紙のサンドイッチしたものの周囲 50

にある緩衝液を乾燥させる。上部電極（陰極）を重ねたものの上に注意深く置く。その上に、おしを置く。電極を接続し、転写を始める。実行時間は $1\text{mA}/\text{cm}^2$ の電流で1時間である。転写後、電源を切り離す。装置を注意深く分解する。方向を追跡するために（通常、左下隅、1番レーンを切り取ることで）膜に印をつける。膜をTBS-Tで3回洗浄する。ブロッキング緩衝液（TBS-Tに溶解した5%（w/v）脱脂粉乳）を添加する。30分間攪拌しながら室温でインキュベートする。膜をTBS-Tで3回洗浄する。mAB 6H4（ $2\text{mg}/\text{ml}$ ）2.5 μl に、TBS-Tに溶解した1%（w/v）脱脂粉乳12.5mlを添加する。1時間攪拌しながら室温で、または4℃で一晩インキュベートする。膜を抗体溶液から取り出し、TBS-Tで3回（各10分）洗浄する。関連する抗マウスIgG1-HRP 1.25 μl に、TBS-Tに溶解した1%（w/v）脱脂粉乳12.5mlを添加する。1時間攪拌しながら室温でインキュベートする。膜を抗体溶液から取り出し、TBS-Tで3回（各15分）洗浄する。ECLウエスタンブロット検出試薬（アマシャムファルマシアバイオテク（Amersham Pharmacia Biotech））からの検出溶液1mlと検出溶液2mlを混合する。攪拌することなく正確に1分間、室温でインキュベートする。膜を吸い取り紙の上に置くことで、過剰な検出試薬を取り除く。膜を、タンパク質側を下にしてサランラップの上に穏やかに置く。膜に力を加えないようにしながら、覆いを作るようにサランラップをくっつける。膜をタンパク質側を上にしてフィルムカセットに入れる。できるだけ速やかに作業を行う。明かりを消し、1枚のオートラジオグラフィフィルム（例えば、Hyperfilm ECL）を膜の上に注意深く置き、カセットを閉じ、数秒間（15秒、30秒）暴露させる。

【0103】

実施例2：PAA法

対象となるタンパク質を磁気ビーズにカップリングさせる。タンパク質 $100\mu\text{g}$ を、約1mlのカップリング緩衝液（0.1Mホウ酸緩衝液（pH9.5）： H_3BO_3 6.183gを蒸留水800mlに溶解し、5M NaOHを用いてpHを9.5に調節し、体積を蒸留水で1000mlに調節する；必要に応じて、透析によって緩衝液を交換する）に入れる。（カップリングを過剰量の存在下で行う場合、カップリング緩衝液1mlに対して1mgを用いた）。ピペットを使用し、約1分間ボルテックスすることで、ダイナールによってトシル活性化されたDynabeads M-280の均一な懸濁液を作成する。Dynabeads 1mlをピペットで取り、以下のように洗浄する：チューブをDYNAL MPCに入れる。分離するために2分間放置する。Dynabeadsを乱さないように注意しながら上清を除去する。DYNAL MPCからチューブを取り出し、PBSにDynabeadsを再懸濁する。これらの段階を繰り返し、Dynabeadsを、抗体を含むカップリング緩衝液に再懸濁する。ティルトローションを行いながら37℃で24時間インキュベートする。チューブを磁石の中に3分間入れ、上清を除去する。コーティングされたDynabeadsを6回洗浄する：室温で5分間、PBS/BSA（0.1%（w/v）ウシ血清アルブミン（最終濃度）をPBSに添加）（pH7.4）で2回；37℃で4時間、ブロッキング緩衝液（0.1%（w/v）BSAを含む0.2M Tris（pH8.5）：Tris 2.42gを蒸留水80mlに溶解し、1M HClを用いてpHを8.5に調節し、0.1%BSAを添加し、体積を蒸留水で100mlに調節する）で1回；室温で5分間、PBS/BSA（pH7.4）で1回；10分間、1%Tween 20で1回；室温で5分間、PBS/BSA（pH7.4）で1回。コーティングされたDynabeadsをPBS/BSA（pH7.4）、0.02%アジ化ナトリウムに溶解して保存する。次いで、試料Iを調製する。PAA緩衝液（PBSに溶解した3%NP-40/3%Tween 20）1mlを、悲感染脳ホモジネート（タンパク質濃度 $5\text{mg}/\text{ml}$ ；0.5%DOC/0.5NP-40）10 μl に添加する。次いで、試料IIおよびIIIを調製する。PAA緩衝液（PBSに溶解した3%NP-40/3%Tween 20）1mlを、感染脳ホモジネート（タンパク質濃度 $5\text{mg}/\text{ml}$ ；0.5%DOC/0.5NP-40）10 μl に添加する。PKを添加せ

ずに試料 I および試料 I I を 37℃ で 30 分間インキュベートする。最終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の PK (1 mg/ml の PK 50 μl を添加) を添加して試料 I I I を 37℃ で 30 分間インキュベートする。最終濃度が 5 mM (100 mM PMSF 50 μl を添加) になるように、PMSF を全ての試料に添加する。磁気ビーズを完全に再懸濁する。100 μl をピペットで取る。ビーズを試料に添加し、室温で 1.5 時間、連続混合しながらビーズ-試料混合物をインキュベートする。MPC を用いてビーズを集める。室温で 15 秒間ボルテックスし、MPC を用いることで、洗浄緩衝液 1 ml で 3 回、PBS 1 ml で 1 回洗浄する。ビーズを沈降させ、再び MPC を用いて残りの上清を捨てる。1×ローディング緩衝液 24 μl を添加する。5 分間、95℃ に加熱する。試料を -20℃ で保存した場合、ゲルにローディングする前に、再度、95℃ で 30 秒間加熱する。 10

【0104】

このアッセイ法の陽性対照として 6H4 を使用し、陰性対照としてマウス IgG またはマウスアルブミンを使用する (図 4 を参照のこと)。

【0105】

実施例 3

ある特定のマウス血清が、PrP^{Sc} を特異的に認識する IgG を含むかどうかを調べるために、ダイナル社によってマウス IgG に対するヒツジ抗体で既にコーティングされている磁気ビーズを、マウス血清とのプレインキュベーション後に使用した。これらのビーズは、第 1 の陰性対照であった。第 2 の陰性対照として、正常マウス血清からの IgG が PrP のどの形態にも結合しないことを示すために、正常マウス血清とプレインキュベ 20
ーションされた、これらのビーズを使用した。驚くべきことに、ビーズのみでは PrP^{Sc} に対する親和性を示したが、PrP²⁷⁻³⁰ に対して親和性を示さなかった。正常マウス血清とプレインキュベーションすると、PrP²⁷⁻³⁰ も結合した (図 5 を参照のこと)。従って、ダイナルからのヒツジ抗体は、PrP^{Sc} に関連しているが、PK 処理後に消化して切り取られた分子を認識すると仮説を立てた。正常マウス血清とプレインキュベーションすると PrP²⁷⁻³⁰ が結合するので、この血清は、PrP^{Sc} に対して親和性を有する分子を含んでいる可能性がある。

【0106】

実施例 4

総マウス血清タンパク質にカップリングされたビーズは、PrP の如何なる形態に対して 30
も親和性を示さなかった。しかしながら、総血清のカップリングが過剰タンパク質の存在下で行われた場合、ビーズは、モノクローナル抗体 6H4 と同じ、PrP²⁷⁻³⁰ に対する結合を示したが、過剰のアルブミンの存在下でカップリングされたビーズは、依然として、PrP のどの形態に対しても親和性を示さなかった (図 6 を参照のこと)。2 つの条件のカップリング効率の差を測定することはできなかったが、過剰タンパク質の提供が、PrP²⁷⁻³⁰ を結合するビーズの表面上にスポンジを引き起こした可能性がある。

【0107】

実施例 5

本発明者らまた、PK 処理された総脳ホモジネートが存在する時に PrP²⁷⁻³⁰ が結合した場合のように、PK 処理された脳ホモジネートが結合を促進し得るかどうかを調べ 40
た。野生型 C57BL/6 マウスまたは Prnp% マウスからの PK で消化された脳ホモジネートの添加は、PrP²⁷⁻³⁰ に加えて PrP^{Sc} の結合を可能にした。不活性 PK の添加は結合活性に影響を及ぼさなかった (図 7 を参照のこと)。

【0108】

実施例 6

過剰量の存在下でカップリングした場合、PrP²⁷⁻³⁰ を結合する活性が、ヒト、ヒツジ、ウシの血清中、および末期スクレイピー罹患 C57BL/6 マウスの血清中に見出された (データ示さず)。

【0109】

実施例 7

テンプレート指向性リフォールディング仮説によって、 PrP^C および PrP^{Sc} が変換工程間にヘテロ 2 量体を形成することが予測される。従って、本発明者らは、 PrP^B が PrP^C と同一であるかどうかを調べた。しかしながら、過剰量でカップリングした場合、 PrP^B 活性は、野生型マウスの血清と同様のレベルで $Prnp\%$ マウスの血清中に存在した。このことは、 PrP^C が結合活性に寄与しないことを意味している（図 8 を参照のこと）。

【0110】

実施例 8

PrP^B 活性が特別なカップリング条件のみで引き起こされないのであれば、ディファレンシャル硫酸沈殿によるマウス血清の分画によって PrP^B 活性を「精製」することが可能 10
なはずである。実際に、50%より低い硫酸飽和で PrP^B を沈殿させることが可能であった。ここで、各画分のカップリングは過剰タンパク質の存在下で行われた（図 9 を参照のこと）。総マウス血清に対する精製されたウサギ免疫グロブリンは PrP^B を含まないが（データ示さず）、総マウス血清または 25%～50%硫酸飽和で沈殿したタンパク質とブレインキュベーションすると PrP^{27-30} を効率的に結合した。75%～100%硫酸飽和で沈殿したタンパク質とのブレインキュベーションは PrP^B 活性につながらなかった（図 10 を参照のこと）。この発見は、 PrP^B 活性が、ビーズ表面との共有結合架橋とは無関係の、1つまたはそれ以上の血清タンパク質の性質であることを示すので重要である。

【0111】

実施例 9

硫酸分画はヒト血清を用いても可能であったことから（データ示さず）、ヒト血漿の 58 の画分をクロマトグラフィーおよびディファレンシャル沈殿によって得て、 PrP^B の正体の考えをまとめるため結合活性について試験した。全ての画分では過剰タンパク質の存在下でカップリングしなかった。従って、結果は、6H4 またはマウス IgG と直接比較 20
することができる。20 の画分の結果が陽性であった：プラスミノゲン、フィブリノゲン、抗トロンビン III、抗トロンビン III ヘパリン複合体、C1 エラスターゼ阻害剤、第 IX 因子、およびタンパク質混合物を含むいくつかの画分（図 11 を参照のこと）。精製されたプラスミノゲンは PrP^{27-30} に加えて PrP^{Sc} を結合し、精製された 30
フィブリノゲンも同様であった（図 12 を参照のこと）。結果が陰性であった 38 の画分のうち、6 つが精製タンパク質を含んでいた：プロトロンビン複合体濃縮物、アルブミン、活性化プロトロンビン複合体濃縮物、第 XII 因子、およびトロンビン。

【0112】

実施例 10

カルシウムは凝固カスケードにおける重要な補因子であるので、カルシウム複合体を形成することによって凝固が阻害された場合に、 PrP^B 活性が完全なままであるかどうかを調べた。10 mM EDTA の存在下で、プラスミノゲンでは病原性 PrP^{Sc} および PrP^{27-30} が依然として結合したが、フィブリノゲンでは PrP^{27-30} のみが結合した（図 13）。少なくともプラスミノゲンの場合では、この発見は、 PrP^B 活性が 40
非特異的凝固によるものである可能性を否定している。

【0113】

実施例 11

PrP^B は病原性 PrP と選択的に相互作用するが、 PrP^C と相互作用しないので、相互作用はコンフォメーション特異的である可能性がある。アッセイ法が 6 M 尿素の存在下で行われた時に、精製プラスミノゲンを含む画分は PrP^{Sc} も PrP^{27-30} も結合しなかった。これらの条件下では、 PrP^{Sc} はプロテアーゼ感受性になっている（図 14）。 PrP^{Sc} のコンフォメーションは PK 耐性を担っていると考えられているので、本発明者らは、この実験から、プラスミノゲンと PrP^{Sc} との相互作用がコンフォメーション依存的であると結論を下している。

【0114】

実施例 1 2

さらに、プラスミノゲンのPrP^B活性は、プラスミノゲンに対する抗体でコーティングされ、プラスミノゲンとブレインキューベーションされた磁気ビーズを使用することによって、ビーズへの共有結合架橋に依存しないことが明らかになった(図15)。

【0115】

実施例 1 3

さらに、少なくともspPrP^Bは病原性PrPを結合するだけでなく、感染力を結合することも分かった。このために、本発明者らは、溶出およびウエスタンブロットを行う前に、指標tg20マウスに常磁気ビーズの0.2%を皮内接種した。病原性PrPを結合したビーズが接種された動物は全て疾患を発症する(図16、図17)。

10

【0116】

実施例 1 4

特定の標的に対する所与のペプチドまたはタンパク質の結合特性を決定し、特徴付けるための多くの選択肢が先行技術によって提供される。固相結合技術を用いてPrPSc特異的結合パートナーの選択性を決定するための結合アッセイ法として、例えば、マイクロタイタープレートフォーマット、常磁気ビーズ、非磁気ビーズ、プラズモン表面共鳴、インターフェロメトリー、コインシデンス検出、質量分析法(mass spectrometry/mass spectroscopy)、エレクトロスプレー分析、およびそれらの組み合わせが挙げられる。本発明において使用するためには、以下の2つのアプローチが好ましい。

20

【0117】

1. 試験しようとするペプチドもしくはタンパク質またはその断片を固相材料とカップリングさせる：

a. 固相として磁気ビーズなどの微粒子を使用し、免疫沈降を行う。

ペプチドを磁気ビーズにカップリングさせる。ビーズをPrPSc、PrP27-30、またはPrPCとインキュベートする。プリオンタンパク質がペプチドに結合したかどうかを、ウエスタンブロット分析または微粒子イムノアッセイ法によって検出する。

b. 固相としてマイクロタイタープレートの表面を使用し、ELISAを行う。

マイクロタイタープレートのウェルの表面をペプチドでコーティングする。PrPSc、PrP27-30、またはPrPCをウェルに添加する。プリオンタンパク質がペプチドに結合したかどうかをELISAによって検出する。

30

【0118】

2. PrPSc (またはPrP27-30) およびPrPCを固相材料とカップリングさせる：

a. 固相として磁気ビーズなどの微粒子を使用し、免疫沈降を行う。

PrPSc (またはPrP27-30) およびPrPCをそれぞれ磁気ビーズにカップリングさせる。ビーズと、試験しようとするペプチドまたはタンパク質断片とインキュベートする。ペプチドがPrPScに結合したが、PrPCに結合しなかったかどうかをウエスタンブロット分析または微粒子イムノアッセイ法によって検出する。

b. 固相としてマイクロタイタープレートの表面を使用し、ELISAを行う。

40

マイクロタイタープレートのウェルの表面をPrPSc (またはPrP27-30) およびPrPCでそれぞれコーティングする。試験しようとするペプチドまたはタンパク質断片をウェルに添加する。ペプチドがPrPScに結合したが、PrPCに結合しなかったかどうかをELISAによって検出する。

【0119】

実施例 1 5

特定の標的に対するタンパク質の特異的結合に関与するタンパク質の特定の部分を決定および検出するための多くの可能性が先行技術によってもたらされる。

【0120】

PrP^Sの特異的結合パートナーとして適切なプラスミノゲン断片を同定するための方法

50

として、例えば、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイを用いた正の遺伝的選択、細菌タンパク質断片の親和性アッセイ法、およびそれらの組み合わせまたは変形が挙げられる。従って、PrP^{Sc}への特異的結合に関与するプラスミノゲンの部分は、以下のように決定することができる。

【0121】

1. ファージ上にディスプレイされたプラスミノゲン断片および/または変異体のペプチドライブラリーを作成し、それらを、病原性プリオンタンパク質でコーティングされた固相に暴露し、PrP^{Sc}に対して最大結合親和性を有するが、PrP^Cに対して最小親和性を有するクローンを選択する。

【0122】

2. 細菌、酵母、菌類、または真核細胞などの宿主細胞においてプラスミノゲンの断片および/または変異体を発現させ、ペプチドを精製し、標識し、結合活性について試験する。

【0123】

3. 宿主細胞においてプラスミノゲン断片および/または変異体との融合タンパク質を発現させ、結合アッセイ法においてPrP^{Sc}親和性について試験する。

【0124】

参考文献

Aguzzi, A. (1997). Neuro-immune connection in spread of prions in the body? *The Lancet* 349, 742-743.

Aguzzi, A. (1998). Protein conformation dictates prion strain. *Nat Med* 4, 1125-6.

Aguzzi, A., Blättler, T., Klein, M. A., Räber, A. J., Hegyi, I., Frigg, R., Brandner, S., and Weissmann, C. (1997). Tracking prions: the neurografting approach. *Cell Mol Life Sci* 53, 485-95.

Aguzzi, A., and Collinge, J. (1997). Post-exposure prophylaxis after accidental prion inoculation. *Lancet* 350, 1519-20.

10

Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1997). Prion research: the next frontiers. *Nature* 389, 795-798.

Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1998). Spongiform encephalopathies. The prion's perplexing persistence. *Nature* 392, 763-4.

Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1996). Spongiform encephalopathies: a suspicious signature. *Nature* 383, 666-7.

20

Bernoulli, C., Siegfried, J., Baumgartner, G., Regli, F., Rabinowicz, T., Gajdusek, D. C., and Gibbs, C. J. (1977). Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery [letter]. *Lancet* 1, 478-479.

Blättler, T., Brandner, S., Raeber, A. J., Klein, M. A., Voigtländer, T., Weissmann, C., and Aguzzi, A. (1997). PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature* 389, 69-73.

30

Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C., and Aguzzi, A. (1996). Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 379, 339-43.

Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., and Bostock, C. J. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent [see comments]. *Nature* 389, 498-501.

Chazot, G., Broussolle, E., Lapras, C., Blattler, T., Aguzzi, A., and Kopp, N. (1996). New variant of Creutzfeldt-Jakob disease in a 26-year-old French man [letter]. *Lancet* 347, 1181.

10

Duffy, P., Wolf, J., Collins, G., DeVoe, A. G., Streeten, B., and Cowen, D. (1974). Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 290, 692-3.

Fraser, H., Brown, K. L., Stewart, K., McConnell, I., McBride, P., and Williams, A. (1996). Replication of Scrapie in Spleens of Scid Mice Follows Reconstitution With Wild-Type Mouse Bone Marrow. *Journal of General Virology* 77, 1935-1940.

20

Gibbs, C. J., Jr., Joy, A., Heffner, R., Franko, M., Miyazaki, M., Asher, D. M., Parisi, J. E., Brown, P. W., and Gajdusek, D. C. (1985). Clinical and pathological features and laboratory confirmation of Creutzfeldt-Jakob disease in a recipient of pituitary-derived human growth hormone. *N Engl J Med* 313, 734-8.

Hill, A. F., Butterworth, R. J., Joiner, S., Jackson, G., Rossor, M. N., Thomas, D. J., Frosh, A., Tolley, N., Bell, J. E., Spencer, M., King, A., Al-Sarraj, S., Ironside, J. W., Lantos, P. L., and Collinge, J. (1999). Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet* 353, 183-9.

30

Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J., and Lantos, P. (1997). The same prion strain causes vCJD and BSE [letter] [see comments]. *Nature* 389, 448-50.

40

Hill, A. F., Zeidler, M., Ironside, J., and Collinge, J. (1997). Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 349, 99.

Hilton, D. A., Fathers, E., Edwards, P., Ironside, J. W., and Zajicek, J. (1998). Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease [letter]. *Lancet* 352, 703-4.

Kitamoto, T., Muramoto, T., Mohri, S., Dohura, K., and Tateishi, J. (1991). Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Virol.* 65, 6292-6295.

10

Klein, M. A., Frigg, R., Flechsig, E., Raeber, A. J., Kalinke, U., Bluethmann, H., Bootz, F., Suter, M., Zinkernagel, R. M., and Aguzzi, A. (1997). A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 390, 687-90.

Klein, M. A., Frigg, R., Raeber, A. J., Flechsig, E., Hegyi, I., Zinkernagel, R. M., Weissmann, C., and Aguzzi, A. (1998). PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nat Med* 4, 1429-33.

20

Korth, C., Stierli, B., Streit, P., Moser, M., Schaller, O., Fischer, R., Schulz-Schaeffer, W., Kretzschmar, H., Raeber, A., Braun, U., Ehrensperger, F., Hornemann, S., Glockshuber, R., Riek, R., Billeter, M., Wuthrich, K., and Oesch, B. (1997). Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature* 390, 74-7.

Lasmezas, C. I., Cesbron, J. Y., Deslys, J. P., Demaimay, R., Adjou, K. T., Rioux, R., Lemaire, C., Locht, C., and Dormont, D. (1996). Immune system-dependent and -independent replication of the scrapie agent. *J Virol* 70, 1292-5.

30

O'Rourke, K. I., Huff, T. P., Leathers, C. W., Robinson, M. M., and Gorham, J. R. (1994). SCID mouse spleen does not support scrapie agent replication. *J. Gen. Virol.* 75, 1511 - 1514.

Raeber, A. J., Klein, M. A., Frigg, R., Flechsig, E., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1999). PrP-

40

dependent association of prions with splenic but not circulating lymphocytes of scrapie-infected mice. *EMBO J* 18, 2702-2706.

Schreuder, B. E., van Keulen, L. J., Smits, M. A., Langeveld, J. P., and Stegeman, J. A. (1997). Control of scrapie eventually possible? *Vet Q* 19, 105-13.

Schreuder, B. E., van Keulen, L. J., Vromans, M. E., Langeveld, J. P., and Smits, M. A. (1998). Tonsillar biopsy and PrPSc detection in the preclinical diagnosis of scrapie. *Vet Rec* 142, 564-8.

10

Vankeulen, L. J. M., Schreuder, B. E. C., Meloen, R. H., Mooijharkes, G., Vromans, M. E. W., and Langeveld, J. P. M. (1996). Immunohistochemical Detection of Prion Protein in Lymphoid Tissues of Sheep With Natural Scrapie. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 1228-1231.

Weber, T., and Aguzzi, A. (1997). The spectrum of transmissible spongiform encephalopathies. *Intervirology* 40, 198-212.

20

Weissmann, C., and Aguzzi, A. (1997). Bovine spongiform encephalopathy and early onset variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Curr Opin Neurobiol* 7, 695-700.

Wells, G. A., Hawkins, S. A., Green, R. B., Austin, A. R., Dexter, I., Spencer, Y. I., Chaplin, M. J., Stack, M. J., and Dawson, M. (1998). Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Vet Rec* 142, 103-6.

30

Will, R., Cousens, S., Farrington, C., Smith, P., Knight, R., and Ironside, J. (1999). Deaths from variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 353, 9157-9158.

Will, R., Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, and Smith (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347, 921-925.

40

【図面の簡単な説明】

【図1】 I A P法を示す図である。

【図2】 希釈実験のウエスタンブロットおよび I A P 実験を示す。ここで、レーン 1 ~ 6 および 10 は通常のウエスタンブロットを示し、レーン 7 ~ 9 および 11 ~ 13 はイムノアフィニティ精製 (I A P) を示す。

【図3】 プリオン親和性アッセイ法 (P A A) 法を示す図である。

【図4】 P A A の陽性対照および陰性対照を示すウエスタンブロットである。

【図5】 ダイナールによってヒッジ抗マウス I g G A b でコーティングされたビーズは P r P S c に結合するが、P r P 27-30 に結合しないという観察を示す。正常マウス血清とブレインキュベーションすると、P r P 27-30 も結合する。

50

【図6】ビーズにカップリングされた血清タンパク質を用いた結果を示すウエスタンブロットである。* は、過剰タンパク質の存在下でカップリングが行われたことを意味する。

【図7】PK処理された脳ホモジネートをアッセイ法に添加した影響を示す。

【図8】PrP欠損材料を用いた結果を示すウエスタンブロットである。

【図9】硫安沈殿物のPAAを示すウエスタンブロットである。

【図10】ビーズに共有結合によって架橋されていない硫安沈殿物のPAAを示すウエスタンブロットである。

【図11】クロマトグラフィーおよびディファレンシャル沈殿によって得られ、結合活性について試験された、ヒト血漿の58画分のPAA結果を示す。

【図12】精製されたプラスミノゲンおよびフィブリノゲンを用いた結果を示すウエスタンブロットである。

【図13】プラスミノゲンおよびフィブリノゲンの結合活性のカルシウム依存性を示すウエスタンブロットである。

【図14】プラスミノゲンの結合活性がタンパク質の天然の状態に依存することを示すウエスタンブロットである。

【図15】ビーズに共有結合によって架橋されていないプラスミノゲンのPAAを示すウエスタンブロットである。

【図16】バイオアッセイ法の概念を示す。

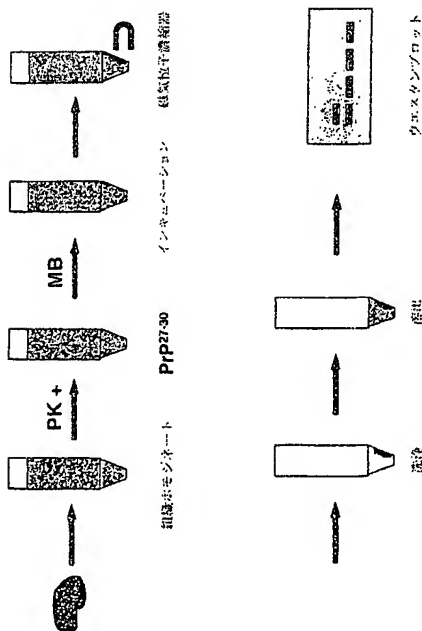
【図17】バイオアッセイ法の結果を示す。

【図18】異なる種に対するプラスミノゲンのPrP^Sの結合活性を示す。

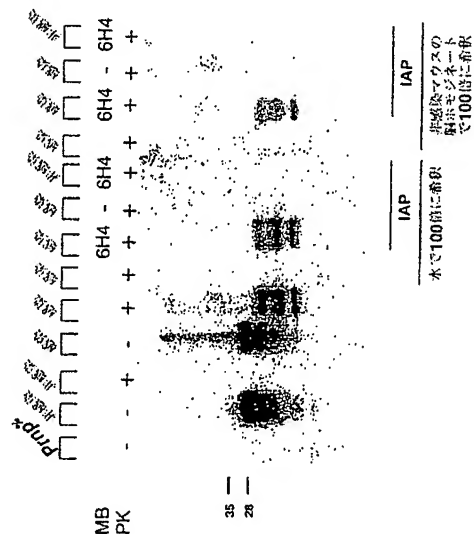
【図19】プラスミノゲンによるヒトPrP^Cの沈殿を示す。

20

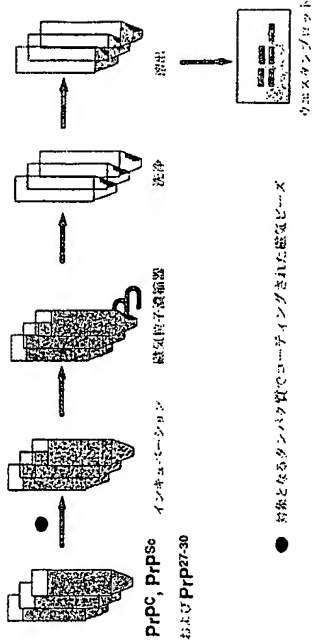
【図1】



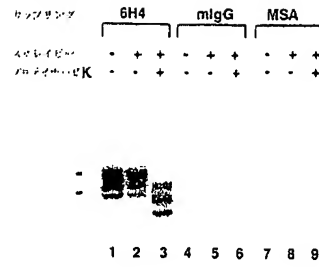
【図2】



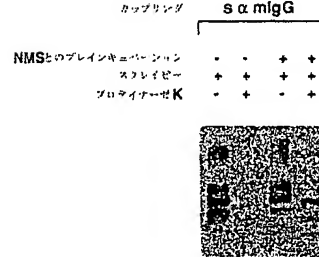
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【図 6】

カプリング	MSA*			NMS*		
スプレッド	+	+	+	+	+	+
プロトタイプK	+	+	+	+	+	+



【図 8】

カプリング	PrP ^K		
CJD	+	+	+
プロトタイプK	+	+	+



【図 7】

カプリング	NMS*			MSA			NMS*		
スプレッド	+	+	+	+	+	+	+	+	+
プロトタイプK	+	+	+	+	+	+	+	+	+

PK処理したPrnp* 陽

PK+PMSP

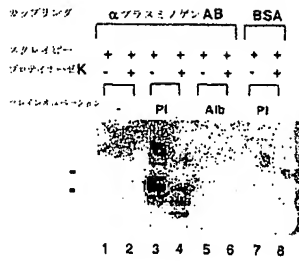


【図 9】

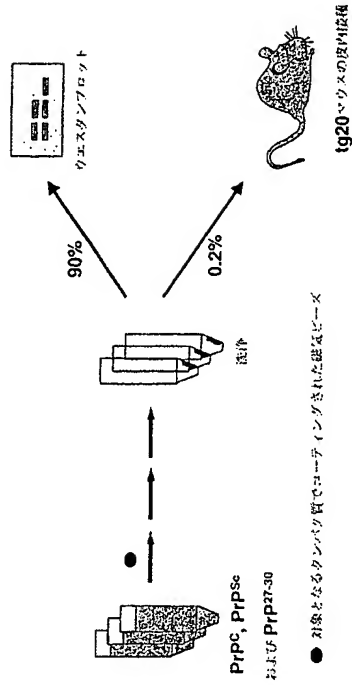
カプリング	25-50%			50-75%			75-100%		
スプレッド	+	+	+	+	+	+	+	+	+
プロトタイプK	+	+	+	+	+	+	+	+	+



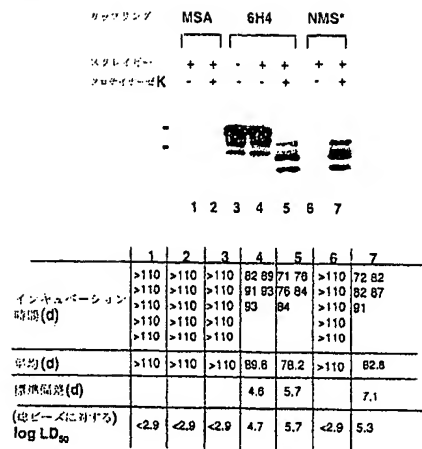
【図15】



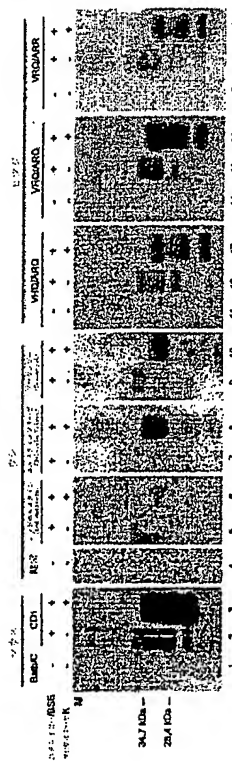
【図16】



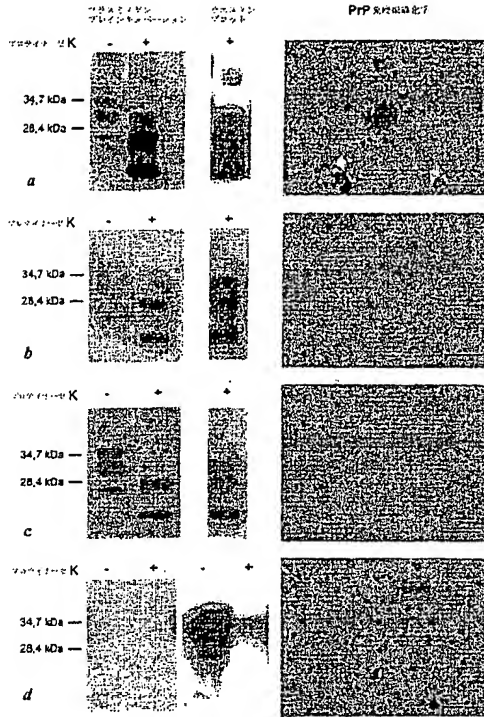
【図17】



【図18】



【図 19】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/00713 A1(51) International Patent Classification: C07K 14/705,
C12N 9/68, C01N 23/68 // C07K 14/75, A61P 25/28(74) Agent: ZIMMER, Franz-Josef, Grünacker, Kitzbühler,
Sackbauer & Schwabacher, Maximilianstrasse 58, 80538
München (DE)

(11) International Application Number: PCT/EP0003481

(81) Designated States (national): AB, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, ES, FI, FR, GB, GR, GT, GU, HK,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MY,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TH,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(12) International Filing Date: 27 March 2001 (27.03.2001)

(13) Filing Language: English

(14) Publication Language: English

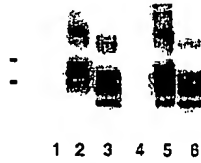
(30) Priority Data:
PCT/IB0000849 26 June 2000 (26.06.2000) IB(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KB, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); European
patent (AM, AZ, BY, CY, CZ, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Applicant (for all designated States except US): UNI-
VERSITÄT ZÜRICH (CH/CH); Winterthurerstrasse 190,
CH-8057 Zürich (CH).Published
— with international search report(72) Inventors and
(73) Inventors/Applicants (for US only): AGUIZZI, Ad-
amo (IT/CH); Mühlengasse 21, CH-8001 Zürich (CH);
FISCHER, Michael, Bern (CH/CH); Bönzelgasse 10,
CH-8050 Dübendorf (CH).For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PRION-BINDING ACTIVITY IN SERUM AND PLASMA DETERMINED AS PLASMINOGEN AND FIBRINOGEN

Coupling	Plasminogen				Fibrinogen			
	-	+	+	-	+	+	-	+
Scrapie	-	+	+	-	+	+	-	+
Prot. K	-	-	+	-	-	-	-	+

(57) Abstract: Disclosed are methods and tools for the
concentration and detection as well as quantification of
pathological prion proteins as well as agents to be used in said
detection and/or in the prevention or treatment of prion diseases.
Said agents are factors with prion binding activities found in
blood serum and blood plasma.

WO 02/00713 A1



WO 02/06713

PCT/EP01/03481

PRION-BINDING ACTIVITY IN SERUM AND PLASMA DETERMINED AS PLASMINOGEN AND
FIBRINOGENField of the Invention

The present invention concerns a method and agents to detect transmissible spongiform encephalopathies as well as agents for the prevention and treatment of respective infections.

Background Art

According to all available evidence, the agents causing transmissible spongiform encephalopathies, termed prions, are devoid of informational nucleic acids and consist of an „infectious“ protein (termed PrP^{Sc}) capable of converting a normal host protein called PrP^C into a likeness of themselves. The only organ system in which histopathological damage and its clinical sequelae can be demonstrated as a consequence of infection with prions is the nervous system (Brandner et al., 1996). This consideration applies to both the human transmissible spongiform encephalopathies, such as Creutzfeldt-Jakob disease, Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrome, Kuru and fatal familial insomnia, and all known prion encephalopathies of animals (Weber and Aguzzi, 1997). The latter comprise scrapie in sheep, bovine spongiform encephalopathy, and chronic wasting diseases of mule, deer and exotic ungulates (Weismann and Aguzzi, 1997).

However, there is no doubt that prions, herewith operationally defined as the infectious agents causing transmissible spongiform encephalopathies, can colonize organs other than the central and peripheral nervous system, and can be demonstrated in extracerebral compartments (Aguzzi et al., 1997). The problem of which organ systems can harbour infectivity is further complicated by the existence of prion strains. Just like strains of conventional viruses, prions can come in various

different flavors, each one of which has its specific preferences with regard to the host range which is infectible and also to the type of cells in which it replicates (Aguzzi, 1998). One paradoxical situation, which is of immediate relevance to the question of blood safety, is exemplified by the radically different organ tropism of the BSE agent in cows and in humans. BSE prions seem to be largely confined to the neural compartment of cows, even after oral exposure (Wells et al., 1998). A very accurate study of the pathogenesis of experimental BSE in cows upon feeding 100 grams of infected brain has disclosed that there is only a short and transient period during which infectivity can be demonstrated in the terminal ileum (Wells et al., 1998). At later time points, BSE prions can only be shown in brain, spinal cord, and dorsal root ganglia. The exact localization of BSE in the terminal ileum is not known. It is being discussed whether infectivity resides in Peyer's patches or in the neural compartment which comprises the Plexus submucosus Meissner and the Plexus myentericus Auerbach. There is a great body of circumstantial evidence that BSE prions can provoke new variant Creutzfeldt-Jakob Disease (nvCJD) (Bruce et al., 1997; Chazot et al., 1996; Hill et al., 1997; Will et al., 1996), but no absolutely final evidence has been produced. For the purpose of the following discussion we will regard the evidence that BSE and new variant Creutzfeldt-Jakob Disease caused by the same agent as sufficiently verified (Aguzzi and Weissmann, 1996). Upon passage into humans, and consecutive progression to manifest nvCJD, prions experience a dramatic shift in their organotropism. Instead of remaining confined mainly to neural structures, they can be detected in many organs belonging to the immune system, including most notably tonsils, spleen, and as recently demonstrated, the appendix (Hilton et al., 1998). It is, therefore, unavoidable to conclude that the tropism of the infectious agent for various structures depends on both the strains of prions in question (and therefore it is in part

WO 02/00713

PCT/EP01/03491

autonomous to its carrier) and on the species in which prion disease manifests itself (Aguzzi and Weissmann, 1998).

These considerations are not only of academic interest. In fact, the transmissibility of the agent by iatrogenic manipulations (i.e. blood transfusions, organ transplants, etc.) is crucially affected by such parameters.

Horizontal Transmissibility of Human Prions:

Prion diseases of humans are undoubtedly transmissible. However, transmission is achieved only under particular circumstances. One could say that in this respect prion diseases fulfill the characteristics of transmissibility delineated by Semmelweis for puerperal fever: these affections are infectious but not contagious. Direct transmissions of brain-derived material from a patient suffering from Creutzfeldt-Jakob disease to other persons have documentedly resulted in transmission of disease. A particularly tragic case occurred in the early seventies in Zurich, when electrodes used for cortical recordings from Creutzfeldt-Jakob patients were sterilized (formaldehyde and alcohol) and used in additional patients. Disease was transmitted to the very young recipients (Bernoulli et al., 1977). Also, transplantation of cornea has most likely resulted in transmission of disease (Duffy et al., 1974).

Despite these tragic dimensions, cases of iatrogenic transmission of CJD via neurosurgical procedures have remained rather rare. This is not totally understood, given that the frequency of subclinical CJD must be much higher than that of manifest disease, and that most neurosurgical instruments are not sterilized in a way that would reliably inactivate prions. Therefore, the quite rare nature of iatrogenic transmission is likely to indicate that host factors, in addition to the virulence of prions, may affect the probability that infection takes place. This

WO 02/08713

PCT/EP01/03481

notion is strengthened by the epidemiology of iatrogenic CJD (ICJD) upon transmission of contaminated dura mater. It has been estimated that several thousands patients, predominantly in Japan, may have been exposed to the CJD agent via preparations of cadaveric dura mater which had been contaminated with prions. However, it appears that less than 2% of those exposed have developed disease so far. While we can rejoice about this low efficiency in the "take" of infectivity, we do not fully understand the biological basis for the apparent protection enjoyed by most subjects exposed to CJD prions. The largest problem with iatrogenic transmission has occurred as result of administration of pituitary hormones of cadaveric origin (Gibbs et al., 1985). Preparations of growth hormone and of gonadotropins contaminated with human prions have caused the death of more than 80 persons, predominantly children. Due to the long latency that can be expected when the agent is introduced into extracerebral sites, such as via intramuscular injection, it must be assumed that further cases from this procedure, which has been stopped more than a decade ago, will arise in the future.

Besides its tragic human dimension and the harm that it has cost to the patients and to their physicians, the pituitary hormone disaster needs to be understood in detail, because the anterior lobe of the pituitary gland is not a part of the central nervous system. Therefore, these events may serve as a paradigm for transmission of prions via contaminated extracerebral tissue that does not belong to the canonical sites of replication of prions. The observation that latency after intracerebral contamination is much shorter than latency after peripheral infection is in good agreement with experimental data from various animal models, and suggest that a rather lengthy phase of extracerebral events (which may include replication of the agent, and invasion of specific extraneuronal systems) may be a precondition to prion neuroinvasion (Aguzzi, 1997).

WO 02/00713

PCT/EP01/03481

Factors influencing the neurotropism of prions:

There is good reason to suspect that neuroinvasive processes in the course of prion infections are very tightly controlled. Perhaps the best argument in this respect derives from the observation that the incubation times of experimental animals inoculated intraperitoneally with scrapie prions are extremely reproducible. Upon inoculation with a known amount of standard inoculum, the experience in various laboratories has been that latencies between inoculation and first clinical symptoms display standard variations in the order of only a few percent points (Klein et al., 1997). If prion neuroinvasion were a totally random process, one would expect a large variability in the incubation times, which would depend on processes governed by chance. However, if some rate-limiting processes control neuroinvasion, these may be responsible for the remarkable precision of the incubation times. Indeed, we very much hope that this interpretation is correct because if such processes exist they might be amenable to manipulation, which in turn may represent a post-exposure strategy to prevent overt prion disease. Indeed, various mechanisms have been explored by which neuroinvasions may be accomplished.

A first phase of neuroinvasion seems to be widespread colonization of the immune system. This colonization can be visualized by homogenizing spleen, lymph nodes, tonsils, and also appendix, and injecting the homogenates into suitable experimental animals. The dilution of the homogenates at which 50% of the experimental animals become sick, contains one ID₅₀ of the infectious agent in each inoculum.

The second phase of neuroinvasion seems to be dependent upon a compartment which cannot be replaced by adoptive bone marrow transfer (Blättler et al., 1997) and which may be represented by the peripheral nervous system and/or the follicular dendritic cells resistant to germinal center of secondary lymphatic organs. It appears that this

WO 02/00713

6

PCT/EP01/03481

second compartment necessitates the expression of normal prion protein in order to support neuroinvasion (Blattler et al., 1997).

Neuroinvasion is dependent on a functional immune system, and immunodeficient mice do not develop disease after inoculation with a moderate dose of the agent (Fraser et al., 1996; Kitamoto et al., 1991; Lamezas et al., 1996; O'Rourke et al., 1994). One crucial component of the immune system necessary for neuroinvasion has been traced to the physical presence of terminally mature B-lymphocytes. To date, it is not clear whether B cells are required because they bind physically prions and carry them to sites of neuroinvasion, or whether B cells produce factors, or induce processes, which are indirectly responsible for facilitating neuroinvasion (Klein et al., 1997). Given the requirement for B-lymphocytes secreting lymphotoxin for the maturation of follicular dendritic cells, and the fact that follicular dendritic cells accumulate large amounts of scrapie prions in experimental situations, it is tempting to speculate that the main function of B-lymphocytes in the aforementioned process consists in allowing FDCs to mature.

The cellular and molecular basis of prion neuroinvasion:

Following experimental inoculation of mice with prions at peripheral sites, there is typically a prolonged, clinically silent replication phase of the infectious agent within the lymphoreticular system (LRS). This occurs prior to detectable neuroinvasion by prions and the subsequent occurrence of neurological symptoms. During this preclinical latency period, prions may replicate to high titers within lymphoreticular tissues. Elucidating the cell types in which prions replicate within the peripheral lymphoid tissue and - crucially - how prions are transported to the central nervous system (CNS) is of great interest and clinical importance. Despite considerable

WO 02/00713

PCT/KP01/03481

evidence implicating the role of the immune system in peripheral prion pathogenesis, there have been few studies on the identity of the cells involved in this process. It has been shown many years ago that whole-body irradiation of mice with gamma rays fails to influence prion pathogenesis or incubation time of scrapie. This has been taken as an argument against significant involvement of proliferating cells in the lymphoreticular phase of prion propagation. Instead, follicular dendritic cells (FDC) have been considered as the prime cell type for prion replication within lymphoid tissue since PrP^{Sc} accumulates in the follicular dendritic network of scrapie infected wild-type and nude mice (Kitamoto et al., 1991). In addition, severe combined immuno deficient mice (SCID), which lack mature B- and T-cells, and which do not appear to have functional FDCs, are highly resistant to scrapie after intraperitoneal inoculation and fail to replicate prions in the spleen (Fraser et al., 1996; Kitamoto et al., 1991; Lasmezas et al., 1996; O'Rourke et al., 1994). Interestingly, bone-marrow reconstitution of SCID mice with wild-type spleen cells restores full susceptibility to scrapie after peripheral infection (Fraser et al., 1996; Klein et al., 1998). These findings suggest that an intact, or at least partially functional, immune system comprising lymphocytes and FDC is required for efficient transfer of prions from the site of peripheral infection to the CNS.

The time course for the development of scrapie disease following intracerebral or intraperitoneal inoculation is highly reproducible and is primarily dependent on the dose of the inoculum. Therefore, neuroinvasion by prions migrating from peripheral lymphoid tissue may depend on tightly controlled, rate-limiting reactions. In order to identify such rate-limiting steps during prion neuroinvasion, PrP^C deficient mice bearing PrP-overexpressing cerebral neurografts were infected intraperitoneally (i.p.). No disease was observed in the grafts, suggesting that neuroinvasion depends on PrP

WO 02/00713

PCT/EP01/03481

expression in extracerebral sites. This was further underlined by reconstitution of the lymphoid system with PrPC expressing cells, which restores infectivity in the lymphoid tissue, but still fails to transport prions to the nervous system.

As prions can be detected in lymphoreticular tissues, an understanding of the peripheral pathogenesis is of immediate importance in assessing risks of iatrogenic transmission of human BSE via exposure to blood or tissues from preclinical cases, and possibly from contaminated surgical instruments, or even blood and blood products. Additionally, such advances might pave the way for the development of sensitive diagnostic tests and the means to block prion neuroinvasion. Why is contamination of the blood supply with prions an important issue? The main problem is new variant CJD. For one thing, we by far do not know as much about the epidemiology and iatrogenic transmissibility of this new disease as we do for sporadic CJD (sCJD). What is most unsettling, the distribution of preclinical disease in Great Britain and possibly in other countries is very obscure, and the little knowledge that is being gathered is far from reassuring (Will et al., 1999). Moreover, there is all reason to believe that nvCJD may be much more "lymphoinvasive" than its sporadic counterpart. In particular, nvCJD prions can be easily detected in lymphatic organs such as tonsils and appendix (Hill et al., 1999; Hill et al., 1997; Hilton et al., 1998), a fact that was previously demonstrated to be true for scrapie (Schreuder et al., 1997; Schreuder et al., 1998; Vankeulen et al., 1996), but not for sCJD prions. While all available evidence points to follicular dendritic cells as the prion reservoir in lymphatic organs, splenic lymphocytes of experimentally inoculated mice can be infected with prions (Raebler et al., 1999). Although prion infectivity of circulating lymphocytes appear to be at least two logs lower than that detected in splenic lymphocytes (Raebler et al., 1999), the possibility that circulating lymphocytes

WO 02/06713

PCT/EP01/03481

may be in equilibrium with their splenic siblings cell for cautionary measures. The nature of the latter is still matter of controversy and debate: leukodepletion has been advocated, but at present there is no certainty about its efficacy, and even whether the presently available technologies for leukoreduction are necessary and/or sufficient for decreasing the threat to blood supply that derives from nvCJD. In addition, it has to be taken into account that, even if blood prion infectivity were to be originally contained in lymphocytes *in vivo*, lysis of cells may lead to contamination of non-particulate fractions and, in the absence of appropriate measures of removal, of stable blood products.

The second consideration applies to secondary prophylaxis. Given the very large numbers of infectious BSE material that has entered the human food chain, it is possible that many individuals harbor preclinical nvCJD. It is imperative and urgent to develop strategies that will help control spread of the agent and that will hopefully prevent the clinical outbreak of symptoms in these persons. Possible targets for the interference with neuroinvasion are rate-limiting processes that control prion replication within the infected individual. In light of the knowledge discussed above, treatments that target the neuro-immune interface of prion replication and neuroinvasion (Aguzzi and Collinge, 1997) seem a promising area for research aimed at post-exposure prophylaxis.

Methods to detect prions and their limitation:

In the age of real-time kinetic polymerase chain reaction (PCR), we have become very spoiled with respect to the detection thresholds which we demand from assays geared at detecting viral contaminants in blood. Consider the case of HIV: here the introduction of quantitative PCR technologies has pushed the limit of detection in blood and blood products down to quasi-perfection. Even when PCR techniques have not proved that

useful, or have not yet met with such widespread acceptance, ultrasensitive immunochemical methods, such as time-resolved fluorescent ELISA, have progressed to a degree of sophistication that is highly satisfactory for most screening application. So why do we still have a problem with prion detection in blood?

The most formidable problem derives from the unique biology of the prion. According to more-or-less accepted wisdom, infectious prions are likely to consist solely of the PrP^{Sc} protein, which has exactly the same amino acid structure as the normal cellular protein PrP^C. A more noncommittal way of wording this fact would be to state that PrP^{Sc} is the only known surrogate marker for prion infectivity; this latter statement is likely to be agreeable upon by both the proponents of the protein-only hypothesis and by those who still believe that the infectious agent is a virus.

The consequence of the fact mentioned above for prion detection is obvious: if prion-specific nucleic acids do not exist, any PCR-based screening assay to detect said nucleic acid will not be an option. Therefore, we are left with immunochemical assays. Besides being less sensitive than PCR by several orders of magnitude, these are also fraught with a series of prion-specific problems. The biggest trouble, again, derives directly from the peculiar biology of TSE agents. As explained above, PrP^{Sc} possesses the same chemical composition as PrP^C, and the latter is a membrane-bound protein that is normally found in many cell types of healthy individuals including white blood cells (Aguzzi and Weissmann, 1997). Although PrP^C and PrP^{Sc} differ in a number of physical properties, it appears to be extremely difficult to develop immunological reagents which reliably differentiate between these two isoforms. Only one monoclonal antibody has been described to react with PrP^{Sc} but not with PrP^C, and its practical usefulness remains to be demonstrated since fourteen months after its publication no follow-up studies have appeared and even the company

WO 02/00713

11

PCT/KP01/03481

which developed this reagent in the first place does not appear to use it in its in-house screening assay for BSE prions.

The hitherto best method for the detection of prions is by performing Western blot analysis with homogenized brain tissue that has been digested with proteinase K (PK). The digestion is necessary since for Western blot analysis the secondary structure is broken up so that no difference is found any more between cellular prions (PrP^C) and pathological prions (PrP^{Sc}), however, while PrP^C is readily digested by PK under specified conditions, PrP^{Sc} is only degraded to relatively large fragments called PrP²⁷⁻³⁰.

It is also already known to concentrate proteins by adsorbing them to so called magnetic beads (MB) to which a specific antibody is bound. However, the application of such a concentration method to PrP has been assumed to be impossible due to the specific features of prions.

Thus, still a great need exists to have a sensitive method or test to detect small amounts of prions of the PrP^{Sc} confirmation not only for diagnosis but also for further investigating the disease, as well as agents to perform such tests.

Brief Description of the Invention

Hence it is one object of the present invention to provide a method for the detection of the pathological prion protein as PrP^{Sc} or PrP²⁷⁻³⁰, respectively.

It is another object of the present invention to provide a method for searching for prion in particular PrP^{Sc} interacting agents.

Still another object of the present invention are agents specifically recognizing PrP^{Sc} and/or PrP²⁷⁻³⁰.

Still another object of the present invention are solid phase materials such as e.g. magnetic beads carrying such agents and composition comprising same.

Still another object of the present invention are compositions comprising such agents for purifying body fluids and sterilization of surgical and diagnostic instruments.

Still another object is to provide an improved method for diagnosing transmissible spongiform encephalopathies (TSE) and means therefor.

PrP^{Sc} is also termed "infectious protein". PrP^{Sc} means a prion protein with a confirmation which differs from the "normal" confirmation of PrP^C in healthy organisms which do not show or develop any signs of TSE.

A "prion binding site which selectively interacts with PrP^{Sc} but not with PrP^C" means a molecule or part of a molecule which can bind to PrP^{Sc} but fails to bind to PrP^C. Such a binding site can be provided e.g. by a low molecular organic compound, a peptide or protein as well as by antigen binding sites of antibodies, wherein said term "antibodies" *inter alia*, comprises conventional antibodies, scFv-fragments (Fab) and (Fab)₂ fragments. The term "selectively" in this context means that a compound having the said binding site reacts at least twofold, preferably at least fivefold, preferably at least tenfold, stronger with the prion protein in the PrP^{Sc} confirmation than with the prion protein in the PrP^C confirmation. Most preferably, the binding site shows at least the selectivity for PrP^{Sc} as shown by plasminogen.

"A factor with prion binding activity" means a compound which can bind to a prion protein and carries the selective prion binding site of the invention. The factor can be a low molecular compound but preferably is a peptide

of at least 10 amino acids length or a protein, which, however, can carry further nonprotein residues such as carbohydrate residues or lipid residues. Said factor can be e.g. of animal or human origin or synthetic.

"Selective prion binding site as contained in plasminogen" means a binding site as provided by a peptide or protein having all or part of the amino acid sequence as contained in a plasminogen of animal or human origin which selectively interacts with Prp^{SC} but not with Prp^C.

"Derivative of plasminogen plasminogen" means a peptide or protein which carries at least one amino acid addition, substitution or deletion compared to the naturally occurring plasminogen or fragment thereof but still capable of selectively interacting with Prp^{SC} and not with Prp^C. Such derivatives can easily be prepared, e.g. by site directed mutagenesis of the nucleic acid encoding the naturally occurring plasminogen or by peptide synthesis.

"Fragment of plasminogen" means a part of a naturally occurring plasminogen which part is capable of selectively interacting with Prp^{SC} and not with Prp^C.

"Carboxy terminus of Prp^{SC}" means the first ... amino acids from the carboxy terminus of a prion protein.

"Ligand" means a compound which selectively binds to the complex of Prp^{SC} with the binding factor according to the invention but does not interact with free Prp^{SC} or free factor alone. Such a ligand can be e.g. an antibody or another receptor type protein.

The present invention *inter alia* relates to a method for the concentration of Prp^{SC} or digestion products thereof, wherein a body fluid or fluidized organ is treated

WO 02/00713

PCT/EP01/03481

14

with solid phase material, the material at least partly carries a prion binding site which selectively interacts with PrP^{Sc} but not with PrP^C. The selectivity of a given binding site can easily be determined as further described herein below. The sufficient selectivity is shown, e.g., by plasminogen.

In this context, "fluidized organ" means tissue derived from an organ and solubilized by mechanical procedures, sonication, or other procedures in order to bring into solution or suspension a significant proportion of its constituents.

In a further preferred embodiment the fluidized organ is a homogenized tissue preferably of the central nervous system, preferably homogenized brain tissue.

In a further preferred method, the body fluid, such as blood, plasma, serum, urine, or lymph is treated with a proteinase, preferably with proteinase K (PK). In a further preferred method the selective prion binding site is contained in a factor with prion binding activity (PrPB). Such factor is preferably a peptide or protein. In case of the peptide or protein, it is of sufficient length to allow stable binding to PrP^{Sc} or the digestion product thereof. A sufficient binding stability (or affinity) is shown, e.g. by plasminogen.

In a further preferred method the solid phase material carries a PrPB as can be found in blood serum or blood plasma, preferably as contained in fraction IX of the ammonium sulfate precipitation of serum or plasma.

In a further preferred method the solid phase material carries a PrPB as can be found in plasminogen, fibrinogen or in plasma fraction I or ammonium sulfate precipitation.

In a further preferred method the PrPB is selected from plasminogen, fibrinogen, sPrPBII and pPrPBII or fragments thereof which fragments show the same selectivity as the complete proteins.

The present invention further relates to a method for the detection and optionally quantification of PrP^{Sc} or digestion products thereof which method comprises the step of selectively binding PrP^{Sc} or the digestion product thereof to a prion binding site as defined above.

In a preferred embodiment the prion binding site is contained in a factor with prion binding activity.

In a preferred embodiment, the factor is selected from factors as contained in blood serum, blood plasma, serum or plasma fractions II of ammonium sulfate precipitation, plasma fraction I of ammonium sulfate precipitation or as provided by plasminogen, fibrinogen, sPrPBII and pPrPBII or fragments thereof which show a similar selectivity as the complete proteins.

The detection of the produced complex between PrP^{Sc} and the prion binding site can be done by any method currently applicable to the detection of such protein complexes, e.g., by any type of affinity assays or in particular immunoassays as, e.g., described in "The Immunoassay Handbook" of David Wild, Second Edition ISBN 0-33-72306-6, Nature Publishing Group. In order to achieve high sensitivity, a fluorescence detection method is preferred.

The present invention further provides for the first time a composition comprising a PrP^{Sc} or digestion product thereof and a material carrying a prion binding site which selectively interacts with PrP^{Sc} but not with

WO 02/00713

14

PCT/EP01/03481

PrP^C. According to a preferred embodiment, the prion binding site is contained in a factor with prion binding activity, preferably selected from a factor as contained in blood serum, blood plasma, serum or plasma fraction II of ammonium sulfate precipitation, plasma fraction I of ammonium sulfate precipitation or as contained in plasminogen, fibrinogen, sPrPBII and PrPBII.

The present invention further provides a solid phase material which carries a prion binding site of the invention, which binding site is preferably contained in a factor with prion binding activity which factor is preferably a factor selected from a factor as contained in plasma serum, blood plasma, serum or plasma fraction II of ammonium sulfate precipitation, plasma fraction I of ammonium sulfate precipitation or as contained in plasminogen, fibrinogen, sPrPBII and PrPBII.

The present invention further provides a protein complex which comprises a PrP^{Sc} and a factor with a prion binding site which selectively interacts with PrP^{Sc} but not PrP^C, preferably selective PrP^{Sc} a binding site as contained in plasminogen.

The present invention further provides a test kit for the detection of pathological prion protein such as PrP^{Sc}, in body fluids or organs such as blood, urine, cerebrospinal fluid, brain tissue, lymph nodes, tonsils which kit comprises a factor with a prion binding site according to the invention and the factor is preferably selected from a factor as contained in blood serum, blood plasma, serum or plasma fraction II of ammonium sulfate precipitation, plasma fraction I of ammonium sulfate precipitation or as contained in plasminogen, fibrinogen, sPrPBII and PrPBII.

The present invention further provides an assay for the diagnosis of human transmissible human spongiform

WO 02/00713

17

PCT/EP01/03481

encephalopathies or prion encephalopathies of animals comprising the step of contacting the sample to be tested with a prion binding site which selectively interacts with PrP^{Sc} but not with PrP^C. In a preferred embodiment the sample is derived from blood. The tested animal or human is diagnosed positive, i.e. for running risk of developing a transmissible spongiform encephalopathy if PrP^{Sc} can be detected in the tested sample.

The present invention for the first time allows the detection of PrP^{Sc} in a sample which may contain also normal PrP^C by using a binding factor for PrP^C which contains the selective prion binding site according to the invention.

In a further aspect of the invention, the carboxy terminal part of PrP^{Sc} is the target for the selective binding site. It has surprisingly been found that the carboxy terminus of PrP^{Sc} provides a binding site which allows discrimination between PrP^{Sc} and PrP^C, which binding site is a preferred target for the binding sites according to the present invention.

It has further surprisingly been found that the binding sites according to the present invention strongly discriminate between PrP^{Sc} and PrP^C of different species although it is known that sequence variations exist between prion proteins from different species. Therefore, PrP^{Sc} of different species can be detected by the use of a single prion binding site according to the invention. A very much preferred binding site is the binding site as contained in human plasminogen. It was surprisingly found that the plasminogen binding site interacts with disease associated prion protein from species. The findings according to the invention further suggest that a property common to PrP^{Sc} of various species rather than the peculiarities private to the specific protein structure of individual PrP^{Sc}

WO 02/00713

18

PCT/EP01/03483

molecules are responsible for binding to the binding sites in plasminogen.

As a carrier for use in accordance with the present invention, essentially all materials can be considered that are currently available to perform biological assays for detecting a given compound in a biological sample. Such a carrier includes magnetic beads, filter stripes, walls of microtiter plates.

According to one aspect of the present invention, the detection of PrP^{Sc} could be done "indirectly" in that first a complex is formed between PrP^{Sc} and the binding site according to the present invention and the so-formed complex is then selectively detected by a ligand, such as an antibody. Such a ligand which selectively interacts with an epitope formed by the interaction of PrP^{Sc} and its binding factor is also highly selective and detects such a complex only but neither detects free PrP^{Sc} nor free factor according to the invention only.

The products according to the invention are useful to provide new diagnostic kits which contain all ingredients for performing assays in order to detect PrP^{Sc}. Such kits may contain in addition to the products according to the invention buffers, reagents for detecting a product being the result of the presence of PrP^{Sc} in a sample, the working instructions on how to reliably perform an assay.

Since PrP^{Sc} as such is an essential element in the development of TSE reducing the availability of free PrP^{Sc} can be a useful means to avoid and or reduce the speed of BSE development. A means for reducing free PrP^{Sc} is the binding of PrP^{Sc} to a binding site according to the invention, which binding site hence can form part of the pharmaceutical composition.

Alternatively, the binding site according to the invention can be used for removing PrP^{Sc} from a biological bacteria, e.g., in the form of a dialysis wherein blood of the animal to be tested is continuously brought into contact with a carrier containing the binding site of the invention.

The present invention hence allows for the first time a reliable method for diagnosing human transmissible spongiform encephalopathies and prion encephalopathies of animals in which method the material of the animal to be tested is brought into contact with the binding site according to the invention.

In a preferred method of the present invention for the concentration of PrP^{Sc} or digestion products thereof, a body fluid, such as e.g. blood, urine, cerebrospinal fluid etc., or fluidized organ, such as brain tissue, lymph nodes, tonsils etc., is treated with a solid phase material such as magnetic beads (MB) whereby at least part of said material or beads, respectively, carries a prion binding site. A preferred prion binding site is a factor with prion binding activity (PrPB).

The method works very well with a fluidized organ, in particular homogenized tissue of central nervous system, preferably homogenized brain tissue.

In cases where the prion binding site can only distinguish PrP^C and PrP^{Sc} in digested form, it is necessary to digest the fluid or fluidized organ prior to the actual concentration step. A suitable digestion is obtained by digestion with proteinase K (PK), whereby it is important to inactivate the proteinase K prior to the addition of the solid phase, e.g. MBs.

Methods are, however, preferred which do not require the digestion of the starting material in order to achieve selectivity for the PrP^{Sc}.

Preferred solid phase materials carrying PrPB can be prepared by coupling such materials with blood serum, or blood plasma, such as fresh frozen plasma of mammals, whereby an excess of protein is present during the coupling procedure. Such factors are designated spPrPB (s= serum and p= plasma) (see below). Even more preferred solid materials carrying PrPB are prepared by coupling purified plasminogen or fibrinogen or fragments thereof to solid phase such as the beads (see below).

Very suitable solid materials are magnetic beads since they can easily be treated with specific components of interests and easily be collected by applying a magnetic field.

A further preferred method of the present invention concerns the detection (and optionally quantification) of PrP^{Sc} or digestion products thereof, wherein PrP^{Sc} is first concentrated as described above, optionally also with previous digestion of the fluid or fluidized organ, and then detected and optionally compared with a standard. A suitable detection method is Western blot analysis. Such test may furthermore be embodied by other detection methods such as a microtiter plate format immunoassay (e.g. ELISA assay), an immunoprecipitation assay, a BIAcore assay, immunocytochemical assay, histoblot assay etc.

Besides of the above mentioned methods, the present invention also concerns factors with prion binding activities such as sPrPBII, which is a prion binding activity in fraction II of ammonium sulfate precipitation of serum or pPrPBII which is a factor with prion binding activity in fraction II of ammonium sulfate precipitation of normal or fresh frozen plasma. Said factors are of course subject matter of the present invention in any form,

such as in isolated form, or as ingredient in a composition, e.g. in a fraction of ammonium sulfate precipitation.

Said factors can be obtained by concentration and/or isolation of PrPBs whereby serum or plasma is subjected to fractionated ammonium sulfate precipitation thus that a PrPB of interest is precipitated, preferably in only one fraction. A further purification can be obtained by the application of further protein isolation methods.

The factors of the present invention are not only suitable for the detection of prions, in particular PrP^{Sc}, but they have further applications in methods for the purification and removal of pathological prion protein from body fluids and organs, such as blood, urine, cerebrospinal fluid, brain tissue, lymph nodes, tonsils etc., or for the sterilization of surgical and/or diagnostic tools, basing on the affinity of PrPB for the pathological prion protein. They are furthermore tools for a therapy regimen based on the modulation of production of PrPB for preventing the spread of prions in the body. Especially suitable in this respect is plasminogen, that is also especially suitable for the purification of body fluids, e.g. blood units. Such purification may e.g. be performed by treating fluids with PrPBip, in particular with immobilized plasminogen or plasma fractions containing same.

Also part of the present invention is a test for the detection of pathological prion protein such as PrP^{Sc} in body fluids or organs such as blood, urine, cerebrospinal fluid, brain tissue, lymph nodes, tonsils etc., that utilizes the specific binding properties of PrPB to pathological prion protein. Such test can be embodied as a microtiter plate format immunoassay, e.g. ELISA assay, an immunoprecipitation assay, a BIACORE assay, immunocytochemical assay, histoblot assay etc.

Also the DNA sequences specific for biosynthesis of PrPB are comprised by the present invention

as well as vectors able to express such DNA sequences in suitable hosts.

Furthermore comprised by the present invention are: a method for purification of PrPB by using Prp²⁷⁻³⁰ as bait; monoclonal and polyclonal antibodies produced in animals such as mice, rabbits, chicken etc., and directed against PrPB; single-chain Fv fragments and other types of fragments of antibodies produced in recombinant phages or in other recombinant systems, and directed against PrPB; a test predictive of susceptibility to prion diseases based on polymorphisms of PrPB, or on variations in the strength and pattern of production of PrPB; a transgenic animal, e.g. mouse that overproduces PrPB in brain, lymph nodes, or other organs, to be used in a bioassay for prions; a knockout animal, in particular a mouse, which is devoid of PrPB, to be used in a bioassay for prions; a production method of PrPB by expressing a DNA sequence specific for the biosynthesis of PrPB in a suitable host cell, such as bacteria, yeast, fungi, or eukaryotic cells, and by purification of PrPB from the aforementioned organisms; a use of natural or synthetic, preferably purified PrPB as a medicament for therapeutical applications in humans and animals; a vaccination of organisms with natural or synthetic PrPB, in particular plasminogen; a diagnostic assay for human and/or animal diseases resulting from abnormal production and/or metabolism of PrPB.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a scheme showing the IAP method.

Figure 2 shows Western Blots and IAP experiments of dilution experiments, whereby lanes 1 to 6 and 10 represent usual Western Blots and lanes 7 to 9 and 11 to 13 represent immuno affinity purification (IAP).

Figure 3 is a scheme showing the prion affinity assay (PAA) method.

Figure 4 represents Western Blots showing positive and negative controls of the PAA.

Figure 5 shows the observation that beads coated with sheep anti mouse IgG Abs by DYNAL bind PrPSc but not PrP27-30. Upon preincubation with normal mouse serum PrP27-30 is also bound.

Figure 6 represents Western Blots showing the results with serum proteins that are coupled to beads. The * means that the coupling was performed in the presence of an excess of proteins.

Figure 7 shows the effect of the addition of PK-treated brain homogenate to the assay.

Figure 8 represents Western Blots showing the results with PrP-deficient material.

Figure 9 represents Western Blots showing PAA of ammonium sulfate precipitates.

Figure 10 represents Western Blots showing PAA of ammonium sulfate precipitates that are not covalently crosslinked to the beads.

Figure 11 shows the result of the PAA of the 58 fractions of human plasma that were obtained by chromatography and differential precipitation and tested for binding activity.

Figure 12 represents Western Blots showing the results with purified plasminogen and fibrinogen.

Figure 13 represents Western Blots showing the calcium dependency of the binding activity of plasminogen and fibrinogen.

Figure 14 represents Western Blots showing the dependency of the binding activity of plasminogen on the native state of the proteins.

Figure 15 represents Western Blots showing PAA of plasminogen that is not covalently crosslinked to the beads.

Figure 16 shows the concepts of the bioassay.

Figure 17 shows the results of the bioassay.

Figure 18 shows PrP^{Sc} binding activity of plasminogen to different species.

Figure 19 shows precipitation of human PrP^{Sc} by plasminogen.

Detailed Description of the Invention

As already mentioned above, there is a great need for a detection method for low concentrations of PrP^{Sc} that can be used as a diagnostic test for transmissible spongiform encephalopathies (TSEs).

There are basically three diagnostic principles for TSEs: histopathological detection of the typical spongiform changes in the CNS, detection of the scrapie-specific isoform of the prion protein, and the bioassay that detects infectivity. All these methods have limitations: histopathology is not useful for preclinical diagnosis since the structural changes appear late in the incubation period. Detection of the scrapie the Western specific isoform of prion protein is more sensitive but still much less sensitive than the bioassay. The bioassay can, in principle, detect as little as 1 infectious unit but can last months or even years.

The hitherto used Western blot technique is based on the partial protease resistance of PrP^{Sc} that allows to distinguish between PrP^C and PrP^{Sc}. After protease treatment, PrP²⁷⁻³⁰ - the protease resistant core of PrP^{Sc} - can be detected but not PrP^C which is completely digested.

Although due to the "stickiness" of prions it was generally assumed that immuno affinity purification (IAP) cannot be applied, it has now been found that concentration can be achieved by applying magnetic beads (MB) carrying a prion binding site, preferably a factor with prion protein binding activity (PrPB).

Thus, because the sensitivity of detection of absolute amounts of PrP²⁷⁻³⁰ is a function of antibody affinity, and cannot be easily increased for each given antibody, in the scope of the present invention, despite of

the hitherto assumed problems, first an „immuno affinity purification“ (IAP) assay has been developed, using antibodies covalently crosslinked to solid phase material, e.g. magnetic beads. Because the monoclonal antibody (6H4 purchased at Prionics, Zurich, Switzerland, described in Korth et al., 1997), originally used for the development of the IAP, is not able to distinguish between PrP^C and PrP^{Sc} (it binds both undigested forms as well as digested PrP^{Sc}, i.e. PrP²⁷⁻³⁰), it is necessary to perform Proteinase K digestion prior to the IAP (see Fig.1).

For the development of the present IAP method, the following model system was used: Two tests were performed to determine the efficiency of the method. On the one hand, small amounts of a scrapie-infected mouse brain homogenate were diluted with water and then subjected to the PrP^{Sc} concentration method. On the other hand, small amounts of a scrapie-infected brain homogenate was diluted with brain homogenate of non-infected mice in order to simulate a real situation in which a brain homogenate contains low amounts of PrP^{Sc} (see Fig.2).

In Figure 2, lanes 1 to 6 and 10 represent usual Western Blots and lanes 7 to 9 and 11 to 13 represent immuno affinity purification (IAP). PrnP^t is material from PrP deficient mice. MB are of course only used for IAP whereby 6H4 refers to MB coupled with 6H4 antibodies and - refers to uncoupled MBs. PRP^C refers to brain homogenate of non-infected mice and PrP^{Sc} refers to brain homogenate of scrapie-infected mice. PK refers to Proteinase K digestion whereby - refers to non digestion and + to digested homogenate. The same abbreviations are used for the following figures.

For prion analysis in homogenate, in particular of brain tissue, it is important to use in a first homogenation step low concentration of ionic detergent, followed by low speed centrifugation, preferably 500 g 30 minutes, 4°C applied twice. For following steps high

concentration of non-ionic detergent is used and a protein concentration of the homogenate of at most 5 mg/ml.

Conditions for the proteinase K digestion are preferably 50 µg/ml PK, 37°C and at least half an hour.

Suitable incubation conditions for the beads with homogenate are e.g. about 1.5 hours at room temperature, whereby for low concentrations longer incubation times might be preferable.

The concentration step in said first attempt was carried out by adding to digested homogenate magnetic beads (MB) carrying said 6H4.

If a digestion step is needed, it has to be performed prior to the concentration step, whereby the digestion, usually by proteinase K, has to be stopped prior to the concentration step by deactivating the proteinase e.g. with phenyl methyl sulfonyl fluoride or another agent known to the skilled person.

By applying the method of the present invention for e.g. brain tissue homogenate, PrP²⁷⁻³⁰ can be concentrated up to amounts detectable by Western blot analysis from tissue comprising much less pathological prion protein than needed for the hitherto known tests.

Using largely the same procedure, the above described method can also be applied as prion affinity assay (PAA) by exchanging the monoclonal antibody 6H4 by other substances to be examined, for example in order to find a binding partner for PrP^{Sc} (see Fig.3).

As a positive control of this assay 6H4 (see Figure 4, lanes 1-3) is used and as a negative control mouse IgG or mouse albumin (see Figure 4, lanes 4-9).

In order to investigate whether a given mouse serum contains IgG that specifically recognize PrP^{Sc} magnetic beads that are already coated by the company DYNAL with sheep antibodies directed against mouse IgGs were used after preincubation with mouse serum. These beads - used without preincubation - were the first negative control

WO 02/00713

21

PCT/EP01/03451

(see Figure 5, lanes 1-2). As a second negative control these beads preincubated with normal mouse serum were used in order to show that IgGs from normal mouse serum do not bind to any form of PrP (see Figure 5, lanes 3-4). Surprisingly the beads alone showed an affinity to PrP^{Sc} but not to PrP²⁷⁻³⁰. Upon preincubation with normal mouse serum also PrP²⁷⁻³⁰ is bound. Therefore it was hypothesised that the sheep antibodies from DYNAL recognize a molecule that is associated with PrP^{Sc} but digested away after PK-treatment. As PrP²⁷⁻³⁰ is bound upon preincubation with normal mouse serum, this serum might contain the molecule with affinity to PrP^{Sc}.

The beads coupled to total mouse serum proteins did not show any affinity to any form of PrP. However, if the coupling of the total serum was performed in the presence of an excess of protein the beads showed the same binding to PrP²⁷⁻³⁰ as the monoclonal antibody 6H4 (see Figure 6, lanes 4-6) whereas the beads that were coupled in the presence of an excess of albumine still did not show any affinity to any form of PrP (see Figure 6, lanes 1-3). Though it was not possible to measure any difference of the coupling efficiency of the two conditions it might be that offering an excess of proteins causes a sponge on the surface of the beads that binds PrP²⁷⁻³⁰. We also checked whether PK-treated brain homogenate might enhance the binding as in the case of bound PrP²⁷⁻³⁰ total PK-digested brain homogenate is present: the addition of PK-digested brain homogenate from wild-type C57BL/6 mice or Prnp^{0/0} mice allowed to bind PrP^{Sc} in addition to PrP²⁷⁻³⁰ (see Figure 7, lanes 1-3); the addition of inactive PK had no influence on the binding activity (see Figure 7, lanes 7-9). If coupled in the presence of an excess the activity of binding PrP²⁷⁻³⁰ was also found in the serum of man, sheep, cow and in the serum of terminally scrapie-sick C57BL/6 mice (data not shown).

Apart from an artefact it might well be that serum of several species contains activities (collectively

termed PrP^B) that interact specifically with the pathogenic isoform of the prion protein and that are kinetically favoured in binding to the beads. The affinity to PrP^{Sc}-30 could then be understood assuming that native PrP^{Sc} present in sick mice is saturated with PrP^B which might be released upon proteolytic digest. Alternatively, partial proteolysis may expose PrP^B binding sites on PrP^{Sc}. However, the fact that the addition of PK-treated brain homogenate allows to bind PrP^{Sc} indicates that there might be several different interactions leading to our observations.

The template-directed refolding hypothesis predicts that PrP^C and PrP^{Sc} form heterodimers during the conversion process. Therefore we investigated whether PrP^B is identical with PrP^C. However, when coupling in excess PrP^B activity was present in the serum of Prnp^{0/0} mice at levels similar to those of wild-type mice, implying that PrP^C does not contribute to the binding activity (see Figure 8).

If PrP^B activity is not only caused by the special coupling conditions, it should be possible to „purify“ it by fractionating mouse serum by differential ammonium sulfate precipitation. Indeed, it was possible to precipitate PrP^B at an ammonium sulfate saturation below 50% whereby coupling of each fraction was performed in the presence of an excess of protein (see Figure 9). While purified rabbit immunoglobulins against total mouse serum did not contain PrP^B (data not shown), they efficiently bound PrP^{Sc}-30 upon preincubation with full mouse serum (see Figure 10, lanes 1-3) or with proteins precipitating between 25% and 50% ammonium sulfate saturation (see Figure 10, lanes 4-6). Preincubation with proteins precipitating between 75% and 100% ammonium sulfate saturation did not lead to PrP^B activity (see Figure 10, lanes 7-9). This finding is important as it shows that the PrP^B activity is a property of one or more serum proteins independent of the covalent crosslink to the surface of the beads.

As the ammonium sulfate fractionation worked with human serum as well (data not shown), 58 fractions of human plasma were obtained by chromatography and differential precipitation and tested for binding activity to form an idea of the identity of PrP^{B} . All fractions were not coupled in the presence of an excess of proteins. Therefore the results can directly be compared with 6H4 or mouse IgG. 20 fractions tested positive: Plasminogen, fibrinogen, antithrombin III, antithrombin III heparin complex, C1 esterase inhibitor, factor IX and several fractions containing protein mixtures (see Figure 11). Purified plasminogen and also purified fibrinogen bound PrP^{B} in addition to $\text{PrP}^{\text{T7-30}}$ (see Figure 12). Out of the 38 fractions that tested negative, 6 contained purified proteins: Prothrombin complex concentrate, albumin, activated prothrombin complex concentrate, factor XIII and thrombin.

As mentioned, there are some hints that the binding of $\text{PrP}^{\text{T7-30}}$ is caused by different effects. The activity that binds $\text{PrP}^{\text{T7-30}}$ is termed spPrP^{B} (s=serum and p=plasma) as it is present in serum and in plasma. Said activity is comparable to the activity found for plasminogen and fibrinogen. Plasminogen and fibrinogen were furthermore characterized as they both bind also PrP^{B} .

As calcium is an important cofactor in the coagulation cascade it was investigated whether PrP^{B} activity is still intact if coagulation is inhibited by complexing calcium. In the presence of 10 mM EDTA the pathogenic PrP^{B} and $\text{PrP}^{\text{T7-30}}$ were still bound by plasminogen (see Figure 13, lanes 1-3) but only $\text{PrP}^{\text{T7-30}}$ by fibrinogen (see Figure 13, lanes 4-6). At least in the case of plasminogen this finding speaks against the possibility that the PrP^{B} activity is due to unspecific coagulation. Because PrP^{B} selectively interacts with the pathogenic PrP but not with PrP^{C} , interaction may be conformation-specific. When the assay was carried out in the presence of 6M urea the fraction containing purified plasminogen didn't

WO 02/00713

30

PCT/EP01/03481

bind PrP^{Sc} nor PrP^{C} (see Figure 14, lanes 8-9) under these conditions PrP^{Sc} becomes protease-sensitive (see Figure 14, lanes 14-15). As the conformation of PrP^{Sc} is thought to be responsible for the PK resistancy we conclude from this experiment that the interaction of plasminogen and PrP^{Sc} is conformation-dependant.

Furthermore it could be shown that PrP^{Sc} activity of plasminogen is not dependent on the covalent crosslink to the beads by using magnetic beads coated with antibodies directed against plasminogen and preincubated with plasminogen (see Figure 15, lanes 3-4). There are two negative controls: 1. If beads coated with antibodies against plasminogen are not at all preincubated (see Figure 15, lanes 1-2) or preincubated with albumin (see Figure 15, lanes 5-6), the pathogenic isoform of PrP is not bound. 2. If beads coated with albumin are preincubated with plasminogen there is also no binding to the pathogenic isoform of PrP (see Figure 15, lanes 7-8).

Furthermore it could be shown that at least spPrP^{Sc} does not only bind the pathogenic PrP but also infectivity. For this purpose we inoculated indicator tga20 mice i.c. with 0.2% of the paramagnetic beads before eluting the other 98% of the beads and performing a western blot (see Figure 16). The animals that were inoculated with beads that bind the pathogenic PrP did all develop the disease (see Figure 17, lanes 4,5 and 7).

It was also determined whether the interaction between plasminogen and disease-associated prion protein represents a universal feature of spongiform encephalopathies. Human plasminogen (100µg) was linked to tosyl-activated paramagnetic Dynabeads M-280 (Dyna, Oslo, 1 ml). Brain tissues from a healthy mouse (Fig. 18, lane 1), a scrapie-affected mouse (lanes 2-3), pooled brains of Swiss non-affected cows (lane 4) and brains of BSE-affected cows of various breeds (lanes 5-10) were homogenized as described and tested for the presence of PrP^{Sc} . For this,

50µg (mouse) or 1mg (cow) homogenate were incubated with paramagnetic beads coupled to anti-PrP monoclonal antibody 6H4 (data not shown), BSA (negative control; data not shown), or plasminogen. Bead eluates (24µl) were run on SDS-PAGE (5% stacking - 12% resolving) and blotted on nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell, Dassel). For detection of disease-associated PrP, membranes were incubated with 6H4 (Prionics, Zürich) as primary antibody and rabbit-α-mouse IgG₁-HRP (Zymed, San Francisco) as secondary antibody. Membranes were then developed using ECL detection reagents. Signals were recorded on film and/or quantified using a Kodak ImageStation. In all cases, plasminogen immobilized to magnetic beads captured PrP^{Sc} from each species when subjected to the precipitation assay. It has been reported that various breeds of sheep are variably susceptible to scrapie. Susceptibility was mapped to polymorphisms at codons 136, 154, 171 within the sheep *Prnp* gene. Because these polymorphisms occur at the carboxy terminus of the protein and affect basic amino acids, and indirect evidence implies that the carboxy terminus of PrP^{Sc} may participate to the binding to plasminogen, we have investigated whether genetic susceptibility to scrapie in sheep might correlate with the ability of PrP^{Sc} to bind plasminogen. Brain tissue from non-affected and scrapie-affected sheep with the *Prnp* genotypes at codons 136, 154 and 171 of VRQ/ARQ (Fig. 18, lanes 11-13), VRQ/ARQ (lanes 14-16), and VRQ/ARR (lane 17-19) were homogenized and subjected to the prion affinity assay. Plasminogen precipitated PrP^{Sc} from all sheep genotypes investigated. Fig. 18 eluates from plasminogen beads incubated with brain homogenates were subjected to Western blot analysis. Species and breeds are indicated over the respective lanes. Infection with scrapie or with BSE, and digestion of samples with proteinase K, are marked with "+" and "-" signs. Numbers listed underneath each lane indicate individual cows and sheep of various breeds

WO 02/06713

32

PCT/EP01/03481

and *Prnp* genotypes. Plasminogen beads immobilized PrP^{Sc} in all samples tested.

In addition, we tested brain tissues (500µg) from several patients who died of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease, Alzheimer's disease (Fig. 19) and Binswanger's disease (data not shown) with the prion affinity assay. In all assays performed with homogenates of CJD patients, plasminogen was able to precipitate PrP^{Sc} , while no signal was detectable with homogenates of non-CJD patients. Unambiguous positive signals were obtained from cases with plaque-like, patchy-perivascular and synaptic pattern of PrP depositions. The intensity of the PrP^{Sc} signals in the precipitation assays correlated closely with histopathological findings (Fig. 19). In Fig. 19 plasminogen precipitated PrP^{Sc} from brain homogenate of three Swiss sCJD patients (a, b, c) exhibiting extensive plaque-like (a) or scant synaptic accumulation (b,c) of PrP^{Sc} . For control we used brain homogenate from a patient suffering from Alzheimer's disease (d). Proteinase K digestion was carried out as indicated with "+" signs over the corresponding lanes. Corresponding brain sections immunostained with antibody 3F4 (available from Dr. Richard Kascsak, Albert Einstein College, The Bronx, New York, USA or Draco, Denmark, Botrup) to PrP are displayed on the right side. In each case, the plasminogen-based assay and the Western blot show congruent results. In Alzheimer's disease, PrP^{Sc} was detectable (-), but not PrP^{Sc} (+). Scale bars are 50 µm.

Examples:

Example 1: IAP method

The IAP protocol is the following: Bring the brain tissue in a 15 ml FALCON tube, put it on ice and leave it there for all steps. Add Homogenate Buffer (0.5% DOC / 0.5% NP-40 in PBS) to get 10 % (w/v) homogenate. Pass the tissue through a 18 gauge needle and a 22 gauge needle

WO 02/00713

33

PCT/EP01/03481

by sucking up and down for 15 times each. Centrifuge the homogenate for 30 minutes at 500 g and 4°C. Keep the supernatant. Determine the protein concentration. Centrifuge the homogenate for 30 minutes at 500 g and 4°C. Keep the supernatant. If the protein concentration is higher than 10 mg/ml then bring the homogenate to a protein concentration of 10 mg/ml using the homogenate buffer. Bring the homogenate to a protein concentration of 5 mg/ml and 3% Tween 20 / 3% NP-40 all in PBS. Add to the tissue homogenate Proteinase K to get a final concentration of 50 µg/ml. Incubate for 60 minutes at 37°C. Add PMSF to get a final concentration of 5 mM. Add 0.25 volumes of IAP buffer (3% Tween 20 / 3% NP-40 in PBS). Resuspend the magnetic beads (covered with 6E4) according to the protocol described below) thoroughly. Pipette out 100 µl. Remove buffer. Add the homogenate to the beads and incubate the bead-sample mixture with continuous mixing for 1.5 hours at room temperature. Collect the beads using the MPC (strong magnet). Wash three times with 1 ml Washing Buffer (2% Tween 20 / 2% NP-40 in PBS) and once with 1 ml PBS by vortexing for 15 seconds at room temperature and by using the MPC. Spin down the beads, discard the remaining supernatant using again the MPC. Add 24 µl x Loading Buffer (50 mM Tris pH 6.8; 2% SDS; 0.01% bromophenol blue; 10% glycerol). Heat to 95°C for 5 minutes. If the samples are stored at -20°C then heat them again for 30 seconds at 95°C before performing SDS-PAGE followed by western Blot: Assemble the glass plates according to the manufacturer's instructions. Prepare in a Falcon tube the appropriate volume of the Resolving Gel (2.1 ml H₂O, 1.5 ml 40% Acrylamid, 1.3 ml 1.5 M Tris pH 8.8, 50 µl 10% SDS, 50 µl 10% Ammoniumpersulfat, 2 µl TEMED). Mix the components in the order shown. Polymerization will begin as soon as the TEMED has been added. Pour the acrylamide solution into the gap between the glass plates. Leave sufficient space for the stacking gel (the length of the comb plus 1 cm). Using a pasteur pipette carefully overlay the acrylamide with

water. Place the gel in a vertical position at room temperature. After polymerization is complete (30 minutes), pour off the overlay and wash the top of the gel several times with deionized water to remove any unpolymerized acrylamide. Prepare in a Falcon tube the appropriate volume of the Stacking Gel (1.48 ml H₂O, 0.25 ml 40 % Acrylamid, 0.25 ml 1.0 M Tris pH 6.8, 20 µl 10 % SDS, 20 µl 10 % Ammoniumpersulfat, 2 µl TEMED). Mix the components in the order shown. Polymerization will begin as soon as the TEMED has been added. Pour the stacking gel solution directly onto the surface of the polymerized resolving gel. Immediately insert a clean Teflon comb into the stacking gel solution, being careful to avoid trapping air bubbles. Place the gel in a vertical position at room temperature. After polymerization is complete (30 minutes), remove the Teflon comb carefully. Mount the gel in the electrophoresis apparatus. Add Running buffer to the top and bottom reservoirs. Remove any (25 mM Tris, 250 mM glycine, 0.1 % SDS) bubbles that become trapped at the bottom of the gel between the glass plates. Load 24 µl of each of the samples in a predetermined order into the bottom of the wells (1. well: Low-range marker). Load an equal volume of 1x Gel-loading Buffer into any wells that are unused. Attach the electrophoresis apparatus to an electric power supply (the positive electrode should be connected to the bottom reservoir). Apply 10 V/cm to the gel. After the dye front has moved into the resolving gel (30 minutes), increase the voltage to 14 V/cm and run the gel until the bromophenol blue reaches the bottom of the resolving gel (1 hour). Then turn off the power supply. Cut six sheets of absorbent paper (Whatman 3MM or equivalent) and one sheet of nitrocellulose to the size of the gel (6cm x 8 cm). If the paper overlaps the edge of the gel, the current will short-circuit the transfer and bypass the gel, preventing efficient transfer. Wet the absorbent paper, the nitrocellulose and the gel by soaking in Transfer (39 mM glycine, 48 mM Tris, 0.037 % SDS, 20 % methanol) Buffer. On

WO 02/00713

35

PCT/EP01/03491

the bottom plate of the apparatus (the anode), assemble the gel, nitrocellulose, and paper in this order:

- bottom electrode,
- three layers absorbent paper soaked in transfer buffer,
- one nitrocellulose membrane soaked in transfer buffer,
- polyacrylamide gel slightly wetted with transfer buffer,
- three layers absorbent paper soaked in transfer buffer.

Check carefully for air bubbles and gently remove them either by using a gloved hand or by rolling a pipet over the sandwich. Dry any buffer that may surround the gel-paper sandwich. Carefully place the upper electrode (the cathode) on top of the stack. Put a weight on it. Connect the electrodes and commence transfer. Running time is 1 hour with a current of 1 mA/cm². After transfer, disconnect the power source. Carefully disassemble the apparatus. Mark membrane to follow orientation (usually by snipping off lower left-hand corner, the number one lane). Rinse the membrane three times with TBS-T. Add Blocking Buffer (5 % (w/v) nonfat dry milk in TBS-T). Incubate at room temperature with agitation for 30 minutes. Rinse the membrane three times with TBS-T. Add to 2.5 µl of mAb 6E4 (2 mg/ml) 12.5 ml of 1 % (w/v) nonfat dry milk in TBS-T. Incubate at room temperature with agitation for 1 hour or overnight at 4°C. Remove the membrane from the antibody solution and wash three times for 10 minutes each in TBS-T. Add to 1.25 µl of relativ anti mouse IgG1-HRP 12.5 ml of 1 % (w/v) nonfat dry milk in TBS-T. Incubate at room temperature with agitation for 1 hour. Remove the membrane from the antibody solution and wash three times for 15 minutes each in TBS-T. Mix 1 ml of detection solution 1 with 1 ml of detection solution 2 from the ECL Western blotting detection reagents (Amersham Pharmacia Biotech). Incubate for precisely 1 minute at room temperature without

agitation. Drain off excess detection reagent by putting the membrane on a absorbent paper. Gently place the membrane, protein side down, on a SaranWrap. Close SaranWrap to form an envelope avoiding pressure on the membrane. Place the membrane, protein side up, in the film cassette. Work as quickly as possible. Switch off the lights and carefully place a sheet of autoradiography film such as (Hyperfilm ECL) on top of the membrane, close the cassette and expose for some seconds (15", 30").

Example 2: PAA method

Couple the protein of interest to magnetic beads: Bring 100 µg of protein into approx. 1ml of Coupling Buffer (0.1 M borate buffer pH 9.5: dissolve 6.183 g H3BO3 in 800 ml distilled water, Adjust pH to 9.5 using 5 M NaOH and adjust volume to 1000 ml with distilled water; if necessary, change buffer by dialysis). (If coupling was performed in the presence of an excess, 1 mg was used for 1 ml of coupling buffer.) Make a homogeneous suspension of the Dynabeads M-280 Tosylactivated by Dynal using a pipette and by vortexing for approximately 1 min. Pipette out 1 ml of Dynabeads and wash as follows: Place the tube in the DYNAL MPC. Leave to separate for 2 minutes. Remove the supernatant taking care not to disturb the Dynabeads. Remove the tube from the Dynal MPC and resuspend the Dynabeads in PBS. Repeat these steps and resuspend the Dynabeads in the coupling buffer containing the antibodies. Incubate for 24 h at 37°C with tilt rotation. Place the tube in the magnet for 3 minutes and remove the supernatant. Wash the coated Dynabeads six times: 2 x in PBS/BSA (add 0.1 % (w/v) bovine serum albumin (final concentration) to PBS), pH 7.4 for 5 minutes at room temperature; 1 x in Blocking Buffer (0.2 M Tris pH 8.5 with 0.1 % (w/v) BSA: dissolve 2.42 g Tris in 80 ml distilled water. Adjust pH to 8.5 using 1 M HCl, add 0.1 % BSA and adjust volume to 100 ml with distilled water) for 4 h at

37°C; 1 x in PBS/BSA, pH 7.4 for 5 minutes at room temperature; 1 x in 1% Tween 20 for 10 minutes; 1 x in PBS/BSA, pH 7.4 for 5 minutes at room temperature. Store the coated Dynabeads in PBS/BSA pH 7.4, 0.02% sodium azide. Then prepare Sample I: Add 1 ml of PAA Buffer (3% NP-40 / 3% Tween 20 in PBS) to 10 µl of not infected brain homogenate (Protein concentration 5 mg/ml; 0.5% DOC / 0.5 NP-40). Then prepare Sample II and III: Add 1 ml of PAA Buffer (3% NP-40 / 3% Tween 20 in PBS) to 10 µl of infected brain homogenate (Protein concentration 5 mg/ml; 0.5% DOC / 0.5 NP-40). Incubate Sample I and Sample II for 30 minutes at 37°C without PK. Incubate Sample III for 30 minutes at 37°C with PK at final concentration of 50 µg/ml (add 50 µl of PK 1mg/ml). Add PMSF to all samples to get a final concentration of 5 mM (add 50 µl of 100 mM PMSF). Resuspend the Magnetic Beads thoroughly. Pipette out 100 µl. Add the beads to the Samples and incubate the bead-sample mixture with continuous mixing for 1.5 hours at room temperature. Collect the beads using the MPC. Wash three times with 1 ml Washing Buffer and once with 1 ml PBS by vortexing for 15 seconds at room temperature and by using the MPC. Spin down the beads, discard the remaining supernatant using again the MPC. Add 24 µl 1 x Loading Buffer. Heat to 95°C for 5 minutes. If the samples are stored at -20°C then heat them again for 30 seconds at 95°C before loading on the gel.

As a positive control of this assay GE4 is used and as a negative control mouse IgG or mouse albumin (see Figure 4).

Example 3

In order to investigate whether a given mouse serum contains IgG that specifically recognize PrP^{Sc} magnetic beads that are already coated by the company DYNAL with sheep antibodies directed against mouse IgGs were used after preincubation with mouse serum. These beads were the first negative control. As a second negative control these

beads preincubated with normal mouse serum were used in order to show that IgGs from normal mouse serum do not bind to any form of PrP. Surprisingly the beads alone showed an affinity to PrP^{Sc} but not to PrP⁷⁷⁻³⁰. Upon preincubation with normal mouse serum also PrP⁷⁷⁻³⁰ is bound (see Figure 5). Therefore it was hypothesized that the sheep antibodies from DYNAL recognize a molecule that is associated with PrP^{Sc} but digested away after PK-treatment. As PrP⁷⁷⁻³⁰ is bound upon preincubation with normal mouse serum, this serum might contain the molecule with affinity to PrP^{Sc}.

Example 4

The beads coupled to total mouse serum proteins did not show any affinity to any form of PrP. However, if the coupling of the total serum was performed in the presence of an excess of protein the beads showed the same binding to PrP⁷⁷⁻³⁰ as the monoclonal antibody 6H4 whereas the beads that were coupled in the presence of an excess of albumine still did not show any affinity to any form of PrP (see Figure 6). Though it was not possible to measure any difference of the coupling efficiency of the two conditions it might be that offering an excess of proteins causes a sponge on the surface of the beads that binds PrP⁷⁷⁻³⁰.

Example 5

We also checked whether PK-treated brain homogenate might enhance the binding as in the case of bound PrP⁷⁷⁻³⁰ total PK-digested brain homogenate is present: the addition of PK-digested brain homogenate from wild-type C57BL/6 mice or Prnp^{0/0} mice allowed to bind PrP^{Sc} in addition to PrP⁷⁷⁻³⁰; the addition of inactive PK had no influence on the binding activity (see Figure 7).

Example 6

If coupled in the presence of an excess the activity of binding PrP⁷⁷⁻³⁰ was also found in the serum of man, sheep, cow and in the serum of terminally scrapie-sick C57BL/6 mice (data not shown).

Example 7

The template-directed refolding hypothesis predicts that PrP^C and PrP^{Sc} form heterodimers during the conversion process. Therefore we investigated whether PrP^B is identical with PrP^C. However, when coupling in excess PrP^B activity was present in the serum of Prnp^{0/0} mice at levels similar to those of wild-type mice, implying that PrP^C does not contribute to the binding activity (see Figure 8).

Example 8

If PrP^B activity is not only caused by the special coupling conditions, it should be possible to „purify“ it by fractionating mouse serum by differential ammonium sulfate precipitation. Indeed, it was possible to precipitate PrP^B at an ammonium sulfate saturation below 50% whereby coupling of each fraction was performed in the presence of an excess of protein (see Figure 9). While purified rabbit immunoglobulins against total mouse serum did not contain PrP^B (data not shown), they efficiently bound PrP¹⁷⁻³⁰ upon preincubation with full mouse serum or with proteins precipitating between 25% and 50% ammonium sulfate saturation. Preincubation with proteins precipitating between 75% and 100% ammonium sulfate saturation did not lead to PrP^B activity (see Figure 10). This finding is important as it shows that the PrP^B activity is a property of one or more serum proteins independent of the covalent crosslink to the surface of the beads.

Example 9

As the ammonium sulfate fractionation worked with human serum as well (data not shown), 58 fractions of human plasma were obtained by chromatography and differential precipitation and tested for binding activity

to form an idea of the identity of PrP^{S} . All fractions were not coupled in the presence of an excess of proteins. Therefore the results can directly be compared with 6H4 or mouse IgG. 20 fractions tested positive: Plasminogen, fibrinogen, antithrombin III, antithrombin III heparin complex, C1 esterase inhibitor, factor IX and several fractions containing protein mixtures (see Figure 11). Purified plasminogen and also purified fibrinogen bound PrP^{S} in addition to $\text{PrP}^{\text{T1-30}}$ (see Figure 12). Out of the 38 fractions that tested negative, 6 contained purified proteins: Prothrombin complex concentrate, albumin, activated prothrombin complex concentrate, factor XIII and thrombin.

Example 10

As calcium is an important cofactor in the coagulation cascade it was investigated whether PrP^{S} activity is still intact if coagulation is inhibited by complexing calcium. In the presence of 10 mM EDTA the pathogenic PrP^{S} and $\text{PrP}^{\text{T1-30}}$ were still bound by plasminogen but only $\text{PrP}^{\text{T1-30}}$ by fibrinogen (Fig. 13). At least in the case of plasminogen this finding speaks against the possibility that the PrP^{S} activity is due to unspecific coagulation.

Example 11

Because PrP^{S} selectively interacts with the pathogenic PrP but not with PrP^{C} , interaction may be conformation-specific. When the assay was carried out in the presence of 6M urea the fraction containing purified plasminogen didn't bind PrP^{S} nor $\text{PrP}^{\text{T1-30}}$; under these conditions PrP^{S} becomes protease-sensitive (Fig. 14). As the conformation of PrP^{S} is thought to be responsible for the PK resistancy we conclude from this experiment that the interaction of plasminogen and PrP^{S} is conformation-dependant.

Example 12

Furthermore it could be shown that PrP^{sc} activity of plasminogen is not dependent on the covalent crosslink to the beads by using magnetic beads coated with antibodies directed against plasminogen and preincubated with plasminogen (Fig. 15).

Example 13

Furthermore it could be shown that at least spPrP^{sc} does not only bind the pathogenic PrP but also infectivity. For this purpose we inoculated indicator tga20 mice i.c. with 0.2% of the paramagnetic beads before eluting and performing a western blot. The animals that were inoculated with beads that bind the pathogenic PrP did all develop the disease (Fig. 16, Fig. 17).

Example 14

The prior art offers a large number of options for determining and characterizing the binding characteristics of a given peptide or protein to a certain target. Binding assay for determining the selectivity of a PrP^{Sc} specific binding partner using solid state-bound technologies includes e.g. microtiter plate formats, paramagnetic beads, non-magnetic beads, plasmon surface resonance, interferometry, coincidence detection, mass spectrometry/mass spectroscopy, electrospray analysis, and combinations thereof. For use in the present invention the following two approaches are preferred.

1. The peptides or protein or fragments thereof to be tested are coupled to a solid phase material:

a. Use micro particles such as magnetic beads as solid phase and perform immunoprecipitation.

Couple the peptides to magnetic beads. Incubate the beads with PrP^{Sc}, PrP²⁷⁻³⁰ or PrP^C. Detect whether the prion protein has bound to the peptides either by Western blot analysis or by microparticle immunoassay.

b. Use surface of a micro titer plate as solid phase and perform ELISA.

Coat the surface of the wells of a micro titer plate with the peptides. Add PrP^{Sc}, PrP²⁷⁻³⁰ or PrP^C to the wells. Detect whether the prion protein has bound to the peptides by ELISA.

2. PrP^{Sc} (or PrP²⁷⁻³⁰) and PrP^C are coupled to a solid phase material:

a. Use micro particles such as magnetic beads as solid phase and perform immunoprecipitation.

Couple PrP^{Sc} (or PrP²⁷⁻³⁰) and PrP^C, respectively, to magnetic beads. Incubate the beads with the peptides or protein fragments to be tested. Detect whether the peptides have bound to the PrP^{Sc} but not to PrP^C either by Western blot analysis or by microparticle immunoassay.

b. Use surface of a micro titer plate as solid phase and perform ELISA.

Coat the surface of the wells of a micro titer plate with PrP^{Sc} (or PrP²⁷⁻³⁰) and PrP^C, respectively. Add peptides or protein fragments to be tested to the wells. Detect whether the peptides have bound to PrP^{Sc} but not to PrP^C by ELISA.

Example 15

The prior art offers many possibilities to determine and detect certain parts of a protein which are involved in specific binding of the protein to a certain target.

Method to identify suitable fragments of plasminogen as PrP^{Sc} specific binding partners includes e.g. forward genetic selection using phage display, ribosomal display, bacterial protein fragment affinity assay, and combinations or derivations thereof. Accordingly, those parts of plasminogen that are involved

in the specific binding to PrP^{Sc} can be determined as follows:

1. Produce peptide libraries of plasminogen fragments and/or mutants displayed on phage, expose them to a solid phase coated with the pathological prion protein and select for the clones with the maximal binding affinity to PrP^{Sc} but minimal affinity to PrP^C.
2. Express fragments and/or mutants of plasminogen in a host cell such as bacteria, yeast, fungi or eukaryotic cells, purify the peptides, label them and test them for binding activity.
3. Express fusion proteins with plasminogen fragments and/or mutants in a host cell and test them for PrP^{Sc} affinity in a binding assay.

References

- Aguzzi, A. (1997). Neuro-immune connection in spread of prions in the body? *The Lancet* 349, 742-743.
- Aguzzi, A. (1998). Protein conformation dictates prion strain. *Nat Med* 4, 1125-6.
- Aguzzi, A., Blättler, T., Klein, M. A., Rieber, A. J., Hegyi, I., Frigg, R., Brandner, S., and Weissmann, C. (1997). Tracking prions: the neurografting approach. *Cell Mol Life Sci* 53, 485-95.
- Aguzzi, A., and Collinge, J. (1997). Post-exposure prophylaxis after accidental prion inoculation. *Lancet* 350, 1519-20.
- Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1997). Prion research: the next frontiers. *Nature* 389, 795-798.
- Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1998). Spongiform encephalopathies. The prion's perplexing persistence. *Nature* 392, 763-4.
- Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1996). Spongiform encephalopathies: a suspicious signature. *Nature* 383, 666-7.
- Bernoulli, C., Siegfried, J., Baumgartner, G., Regli, F., Rabinowitz, T., Gajdusek, D. C., and Gibbs, C. J. (1977). Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery [letter]. *Lancet* 1, 478-479.
- Blättler, T., Brandner, S., Rieber, A. J., Klein, M. A., Voigtlander, T., Weissmann, C., and Aguzzi, A. (1997). PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature* 389, 69-73.
- Brandner, S., Isenmann, S., Rieber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C., and Aguzzi, A. (1996). Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 379, 339-43.

Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCordle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., and Bostock, C. J. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent [see comments]. *Nature* 389, 498-501.

Chazot, G., Broussole, E., Lapras, C., Blattler, T., Aguzzi, A., and Kopp, W. (1996). New variant of Creutzfeldt-Jakob disease in a 26-year-old French man [letter]. *Lancet* 347, 1181.

Duffy, P., Wolf, J., Collins, G., DeVoe, A. G., Streeten, B., and Cowen, D. (1974). Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 290, 692-3.

Fraser, S., Brown, K. L., Stewart, K., McConnell, I., McBride, P., and Williams, A. (1996). Replication of scrapie in spleens of Scid mice follows reconstitution with wild-type mouse bone marrow. *Journal of General Virology* 77, 1935-1940.

Gibbs, C. J., Jr., Joy, A., Heffner, R., Franko, M., Miyazaki, M., Asher, D. M., Parisi, J. E., Brown, P. W., and Gajdusek, D. C. (1985). Clinical and pathological features and laboratory confirmation of Creutzfeldt-Jakob disease in a recipient of pituitary-derived human growth hormone. *N Engl J Med* 313, 734-8.

Hill, A. F., Sutherland, R. J., Joiner, S., Jackson, G., Rossor, M. N., Thomas, D. J., Frosh, A., Tolley, N., Bell, J. E., Spencer, M., King, A., Al-Sarraj, S., Ironside, J. W., Lantos, P. L., and Collinge, J. (1999). Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet* 353, 183-9.

Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., Dooy, L. J., and Lantos, P. (1997). The same prion strain causes vCJD and BSE [letter] [see comments]. *Nature* 389, 448-50.

- Bill, A. F., Zeidler, M., Ironside, J., and Collinge, J. (1997). Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 349, 99.
- Hilton, D. A., Fathers, E., Edwards, P., Ironside, J. W., and Zajicek, J. (1998). Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease [letter]. *Lancet* 352, 703-4.
- Kitamoto, T., Muramoto, T., Mohri, S., Doh-ura, K., and Tateishi, J. (1991). Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Virol.* 65, 6292-6295.
- Klein, M. A., Frigg, R., Flechsig, E., Raeber, A. J., Kalinke, U., Bluetmann, H., Bootz, F., Suter, M., Zinkernagel, R. M., and Aguzzi, A. (1997). A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 390, 687-90.
- Klein, M. A., Frigg, R., Raeber, A. J., Flechsig, E., Hegyi, I., Zinkernagel, R. M., Weissmann, C., and Aguzzi, A. (1998). PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nat Med* 4, 1429-33.
- Korth, C., Stierli, B., Streit, P., Moser, M., Schaller, O., Fischer, R., Schulz-Schaeffer, W., Kretzschmar, H., Raeber, A., Braun, U., Ehrensperger, F., Hornemann, S., Glockebauer, R., Riek, R., Billeter, M., Wuthrich, K., and Oesch, B. (1997). Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature* 390, 74-7.
- Laszlas, C. I., Caebren, J. Y., Deelye, J. D., Demainay, R., Adjou, K. T., Rioux, R., Lemaire, C., Loch, C., and Dormont, D. (1996). Immune system-dependent and -independent replication of the scrapie agent. *J. Virol.* 70, 1292-5.
- O'Rourke, K. I., Huff, T. P., Leathers, C. W., Robinson, M. M., and Gorham, J. R. (1994). SCID mouse spleen does not support scrapie agent replication. *J. Gen. Virol.* 75, 1511 - 1514.
- Raeber, A. J., Klein, M. A., Frigg, R., Flechsig, E., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1999). PrP-

dependent association of prions with splenic but not circulating lymphocytes of scrapie-infected mice. *EMBO J* 18, 2702-2706.

Schreuder, B. B., van Keulen, L. J., Smits, M. A., Langeveld, J. P., and Stegeman, J. A. (1997). Control of scrapie eventually possible? *Vet Q* 19, 105-13.

Schreuder, B. B., van Keulen, L. J., Vromans, M. E., Langeveld, J. P., and Smits, M. A. (1998). Tonsillar biopsy and PrPSc detection in the preclinical diagnosis of scrapie. *Vet Rec* 142, 564-8.

Vankeulen, L. J. M., Schreuder, B. B. C., Meeuw, R. H., Mooijharkes, G., Vromans, M. E. W., and Langeveld, J. P. M. (1996). Immunohistochemical Detection of Prion Protein in Lymphoid Tissues of Sheep With Natural Scrapie. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 1228-1231.

Weber, T., and Aguzzi, A. (1997). The spectrum of transmissible spongiform encephalopathies. *Intervirology* 40, 198-212.

Weissmann, C., and Aguzzi, A. (1997). Bovine spongiform encephalopathy and early onset variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Curr Opin Neurobiol* 7, 695-700.

Wells, G. A., Hawkins, S. A., Green, R. B., Austin, A. R., Dexter, I., Spencer, Y. I., Chaplin, M. J., Stack, M. J., and Dawson, M. (1998). Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Vet Rec* 142, 103-6.

Will, R., Cousens, S., Farrington, C., Smith, P., Knight, R., and Ironside, J. (1999). Deaths from variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 353, 9157-9158.

Will, R., Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, and Smith (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347, 921-925.

1. Factor which selectively interacts with a PrPSc but not with PrPc.
2. Factor according to claim 1 which is selected from plasminogen, fragments of plasminogen and derivatives thereof.
3. Factor according to any of claims 1 or 2, characterized in that it interacts with the carboxy terminus of PrPSc.
4. Factor according to any of claims 1 to 3, characterized in that it is capable of interacting with PrPSc of different species.
5. Composition comprising a PrPSc and a factor according to any of claims 1 to 4.
6. Composition according to claim 5, wherein PrPSc is bound to the factor.
7. Composition according to claim 6, wherein PrPSc is noncovalently bound to the factor.
8. A carrier comprising a factor according to any of claims 1 to 4 and/or a composition according to any of claims 5 to 7.
9. Carrier according to claim 8 which is selected from magnetic beads, filter stripes, microtiter plates, non-magnetic

beads, plasmon surface resonance plates, microarray plates, liquid carriers undergoing phase transition to solid, and combination thereof.

10. Ligand which specifically interacts with a composition according to any of claims 5 to 7.
11. Diagnostic kits containing a factor according to any of claims 1 to 4 and/or a composition according to any of claims 5 to 7 and/or a carrier according to any of claims 8 and 9 and/or a ligand according to claim 10, optionally together with further components such as buffers, reagents for the detection and working instructions.
12. Pharmaceutical composition comprising a factor according to any of claims 1 to 4 and/or a ligand according to claim 10.
13. A process for detecting a PrPSc in a sample, characterized in that the sample is contacted with a factor according to any of claims 1 to 4 and/or a carrier according to claims 8 or 9 and/or a ligand according to claim 10.
14. A process for removing PrPSc from biological material, comprising the step of contacting the material with a factor according to any of claims 1 to 4 and/or a carrier according to any of claims 8 or 9 and/or a ligand according to claim 10.

WO 02/00713

50

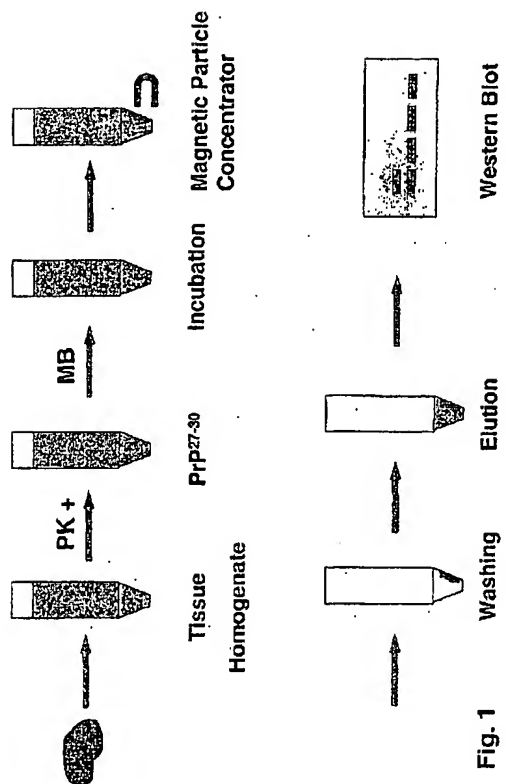
PCT/EP01/03401

15. Method for diagnosing human transmissible spongiform encephalopathies and prion encephalopathies of animals, characterized in that the material of the organism to be tested is brought into contact with a factor according to any of claims 1 to 4 and/or a carrier according to any of claims 8 to 9 and/or a ligand according to claim 10.
16. Use of a factor according to any of claims 1 to 4 and/or a composition according to any of claims 5 to 7 and/or a carrier according to any of claims 8 or 9 and/or a ligand according to claim 10 for the diagnosis of human transmissible spongiform encephalopathies or prion encephalopathies of animals.
17. Use of a factor according to any of claims 1 to 4 and/or a composition according to any of claims 5 to 7 and/or a carrier according to any of claims 8 or 9 and/or a ligand according to claim 10 for removing PrP^{Sc} from and/or inactivating PrP^{Sc} in a biological material.

WO 02/00713

1/13

PCT/EP01/03481



WO 02/00713

2/19

PCT/EP01/03491

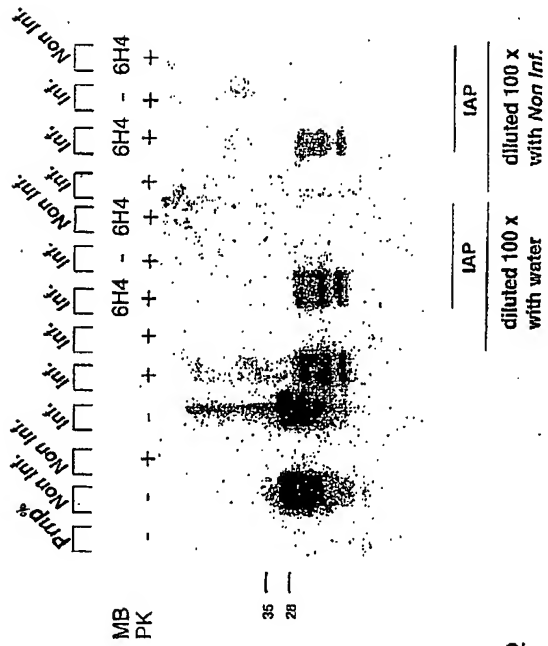


Fig. 2

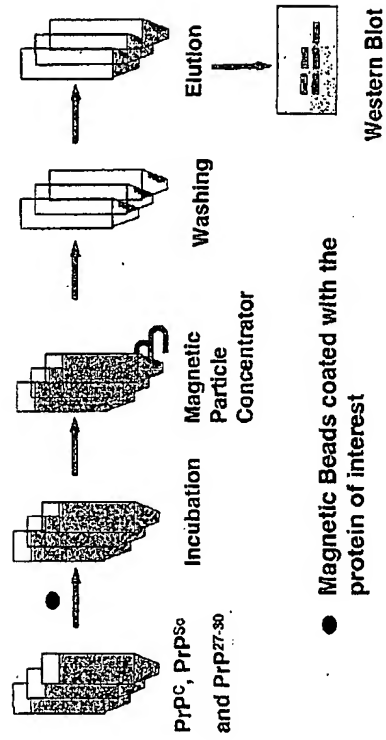


Fig. 3

WO 02/00713

4/19

PCT/EP01/03441

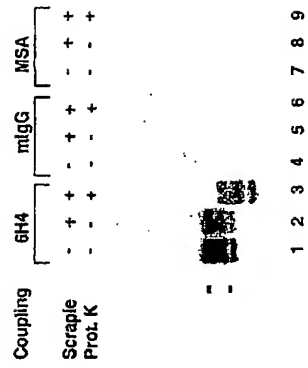


Fig. 4

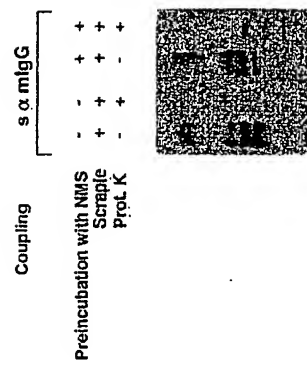


Fig. 5

Coupling	MSA*		NMS*	
	+	-	+	-
Scraple	-	+	-	+
Prot. K	-	-	-	-




Fig. 6

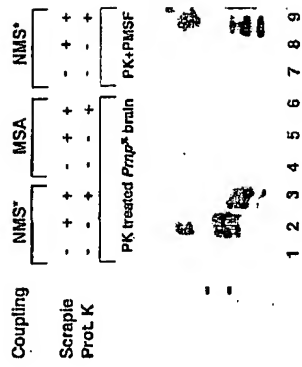


Fig. 7

WO 02/00713

8/19

PCT/EP01/03481

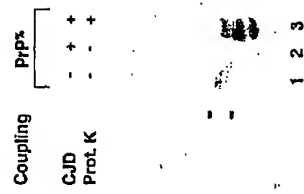


Fig. 8

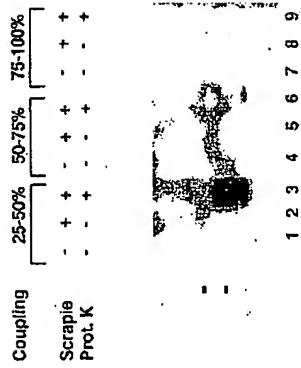


Fig. 9

WO 02/00713

18/19

PCT/EP01/03401

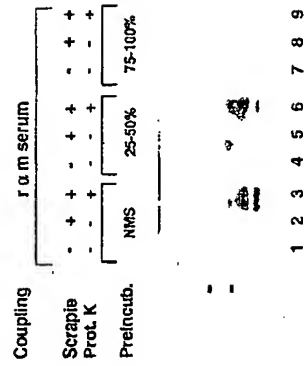


Fig. 10

Fraction	PIP ₂	PIP ₃	PIP ₂ /PIP ₃
Plasminogen	-	-	-
Fibrinogen	-	-	-
Antithrombin III	-	-	-
C1 esterase inhibitor	-	-	-
Antithrombin III heparin complex	-	-	-
Plasma pool	-	-	-
Factor IX, Fibrin sealant 2 (I)	-	-	-
12 fractions containing protein mixtures	-	-	-
Total: 20 positive fractions	-	-	-
Prothrombin complex concentrate	-	-	-
Human albumin	-	-	-
Activated prothrombin complex concentrate	-	-	-
Factor VIII concentrate	-	-	-
Human Thrombin	-	-	-
Factor XIII	-	-	-
Factor IX concentrate, Fibrin sealant 1 (I)	-	-	-
30 fractions containing protein mixtures	-	-	-
Total: 38 negative fractions	-	-	-

Fig. 11

WO 02/00713

12/19

PCT/KP01/03481

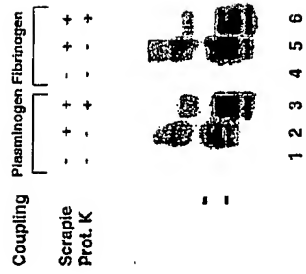


Fig. 12



Fig. 13

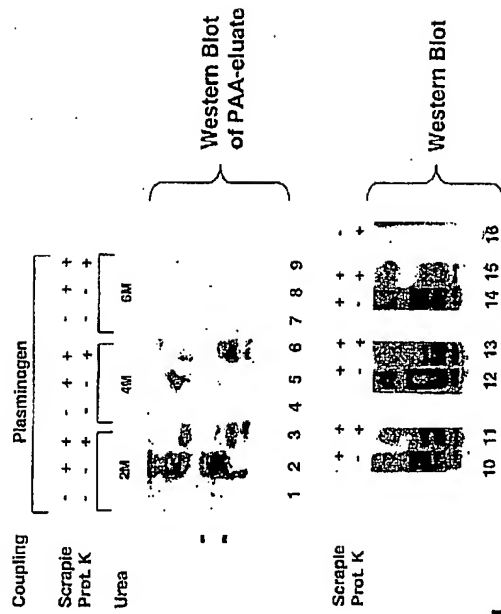


Fig. 14

WO 02/00723

15/19

PCT/EP01/03481

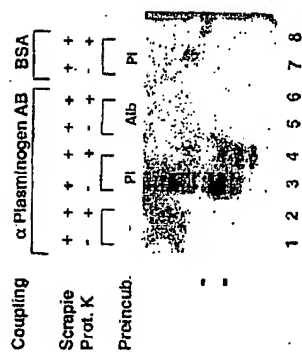


Fig. 15

WO 02/00713

16/19

PCT/EP01/03491

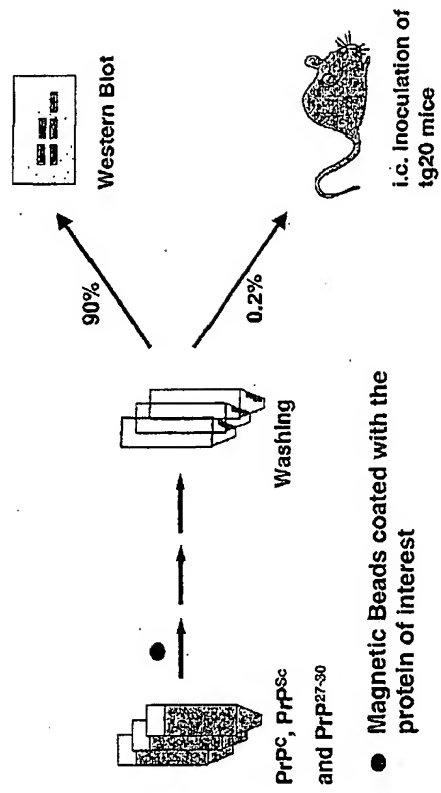


Fig. 16

WO 02/00713

17/19

PCT/EP01/03481

Coupling MSA 6H4 NMS*

Scrapie + + + + +

Prot.K - - - - -



1 2 3 4 5 6 7

	1	2	3	4	5	6	7
Incubation Time (d)	>110	>110	>110	82.85/71.76	>110	72.82	
	>110	>110	>110	91.93/76.84	>110	82.87	
	>110	>110	>110	93	84	>110	91
	>110	>110	>110			>110	
Mean (d)	>110	>110	>110	89.6	78.2	>110	82.8
STDV (d)				4.6	5.7		7.1
log LD ₅₀ (on total beads)	<2.9	<2.9	<2.9	4.7	5.7	<2.9	5.3

Fig. 17

WO 0200713

PCT/EP01/03491

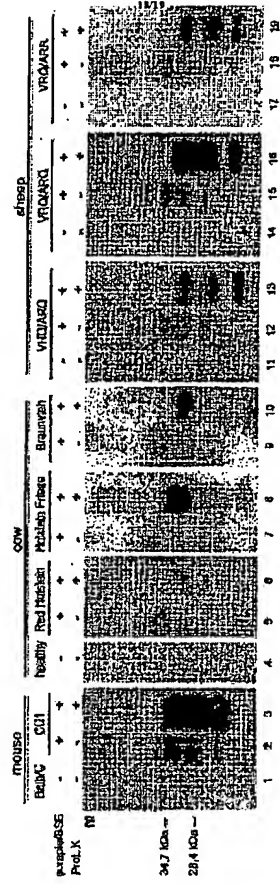
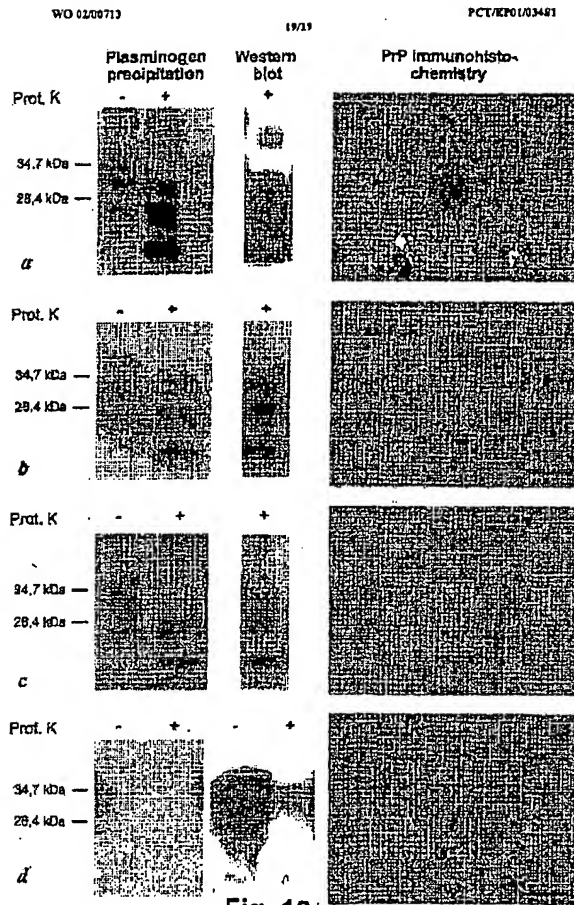


Fig. 18



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		In Application No. PCT/EP 01/03481
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/705 C12N9/68 G01N33/68 //C07K14/75,A61P25/28		
According to International Patent Classification (IPC) and its both national classification and IPC		
B. RELEVANT SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K G01N C12N		
Documentation searched other than minimum documentation in the extent that such documents are included in the fields searched		
Extensive data have been consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevance to claim No.
X	KORTH C ET AL: "Prion (PrPSc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody." NATURE (LONDON), vol. 390, no. 6655, 6 November 1997 (1997-11-06), pages 74-77. XP00206611 ISSN: 0028-0836 cited in the application page 74, left-hand column, paragraph 1; page 76, right-hand column, paragraph 1; figures 1A-D, 2A-B -/-	1,3-9, 11-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Symbols/categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "C" earlier document but posterior to the date of international filing date "I" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is used to establish the prior art date of another claim or other relevant matter (see specific field) "V" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other matter "P" document published prior to the international filing date but not prior to the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but does so in relation to the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be understood without or cannot be considered to be an inventive step without the document in relation to the "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be understood without the document in relation to the document is combined with one or more other such documents, each contribution being essential to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 September 2001		Date of mailing of this international search report 19/09/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5018, Postfach 2 M - 2200 Vienna (Austria) Tel. +43-1-700 540-4740, Fax +43-1-700 540 4740 Post. +43-1-700 540-4740		Authorized officer Steffen, P

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2000)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Application No. PCT/JP 01/03481
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Class of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOCHEMICALIEN UND REAGENZIEN FÜR DIE LIFE-SCIENCE FORSCHUNG, SIGMA PRODUKTKATALOG (DEUTSCHLAND), 1998, pages 905-906, XP002176224 Plasminogen & Plasminogen lysine-binding site 1 (see also Internet: URL: http://www.sigma-aldrich.com/saws.nsf/SigProducts?OpenFrameset) page 906 -A DATABASE SWISS-PROT "Online!" UNIVERSITY OF GENEVA AND EMBL; ACC. NO. P00747, 1 July 1986 (1986-07-01) "Plasminogen 'Precursor!'" XP002176232 the whole document	1-4
P, X	FISCHER MICHAEL & ET AL: "Binding of disease-associated prion protein to plasminogen." NATURE (LONDON), vol. 408, no. 6811, 23 November 2000 (2000-11-23), pages 479-483, XP002176225 ISSN: 0028-0836 page 481, left-hand column, paragraph 2 -page 482, right-hand column, last paragraph; figures 3A, 4C	1-9, 11-17
P, X	CURIN S V ET AL: "SITE-DIRECTED MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFICALLY RECOGNIZES PRP" VOX SANGUINIS, S. KARGER AG, BASEL, CH, vol. 78, no. SUPPL 1, July 2000 (2000-07), page 57 XP000952742 ISSN: 0042-9007 the whole document	1, 3, 5-9, 11-17
P, X	WO 00 73501 A (WEISS STEFAN ; LASMEZAS CORINNE IDA (FR)) 7 December 2000 (2000-12-07) page 17, line 10 -page 21, line 19; figures 3-7	1, 4-9, 11-17
P, X	WO 00 78344 A (CAPRION PHARMACEUTICALS INC ; SLOD USAKIEWICZ JACEK (CA); PINARD MA) 28 December 2000 (2000-12-28) page 16, line 28 -page 20, line 13; figures 5-9, 14, 16	1, 3-9, 11-17
E	WO 01 23425 A (FISCHER MICHAEL BORIS ; AGUZZI ADRIANO (CH); UNIV ZUERICH (CH)) 5 April 2001 (2001-04-05) page 31 -page 33; examples 9-13 -/-	1-9, 11-17

Form PCT/IB/2001/9 (publication of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

vs. Application No.
PCT/EP 01/03481

C(5) (entire document) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Classification of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Reference to claim No.
T	MAISSEN MANUELA ET AL: "Plasminogen binds to disease-associated prion protein of multiple species." LANCET (NORTH AMERICAN EDITION), vol. 357, no. 9273, 2001, pages 2026-2028, XP002176226 ISSN: 0099-5355 the whole document	1-9, 11-17
P, A	MACGREGOR I: "Prion protein and developments in its detection" TRANSFUSION MEDICINE, vol. 11, 11 February 2001 (2001-02-11), page 3-14 XP002176227 page 6 -page 9; figure 2; tables 2,3	
A	BODENER WALTER: "The use of monoclonal antibodies in human prion disease." NATURWISSENSCHAFTEN, vol. 86, no. 5, May 1999 (1999-05), pages 212-220, XP002176228 ISSN: 0028-1042 the whole document	
A	RUBENSTEIN R ET AL: "IMMUNE SURVEILLANCE AND ANTIGEN CONFORMATION DETERMINES HUMORAL IMMUNE RESPONSE TO THE PRION PROTEIN IMMUNOGEN" JOURNAL OF NEUROVIROLOGY, BASINGSTOKE, GB, vol. 5, no. 4, August 1999 (1999-08), pages 401-413, XP000905565 ISSN: 1355-0284 the whole document	
A	SOTO CLAUDIO ET AL: "Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides." LANCET (NORTH AMERICAN EDITION), vol. 355, no. 9199, 2000, pages 192-197, XP002176229 ISSN: 0099-5355 the whole document	
A	HORIUCHI MOTOHIRO ET AL: "Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state." EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 18, no. 12, 15 June 1999 (1999-06-15), pages 3193-3203, XP002176230 ISSN: 0261-4189 the whole document	

From PCT/EP 01/03481, published in Japanese (JP 2004-501626 A)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Pub. No. PCT/EP 01/03481
D. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with abstract, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
A	KANEKO KIYOTOSHI ET AL: "Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 94, no. 19, 1997, pages 10069-10074, XP002176231 1997 ISSN: 0027-8424 the whole document	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/JP 01/03481

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCTASAV 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1, 3-9, 11-17 (all partly) and 10 (completely)

Present claims 1 (completely) and claims 3-9 and 11-17 (partly) relate to a compound and methods defined by reference to a desirable characteristic or property, namely to a structurally undefined factor, which has the property of selectively interacting with a PrPsc but not with PrPc.

The claims cover all compounds and methods having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds (e.g. plasminogen and fibrinogen) and methods. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compounds and methods by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Hence a search for claims 1, 3-9 and 11-17 can only be considered partially complete in the sense that prior art is searched in respect to documents which relate to PrPsc-specific interacting molecules and where such molecules have been shown to be implicated in such an interaction. It can never cover a complete survey of all other existing molecules that potentially interact specifically with PrPsc but not PrPc, and for which such an interaction has not been demonstrated. In this sense the search for claims 1, 3-9, 11-17 is understood to be restricted to such documents only, which relate to a known interaction of a compound specifically with PrPsc. It cannot be understood to be complete for any further existing compound, if any, that has the desired effect, but for which this effect has not been shown yet.

Present claim 10 (completely) and claims 11-17 (partly) relate to a ligand which specifically interacts with a composition of claims 5-7. The application does not provide any evidence to the existence or feasibility of such a ligand, nor how this ligand is defined in terms of chemical or biochemical structural features, apart from again the desired characteristic of specific interaction. Here lack of clarity and support according to article 6 PCT is such, that a meaningful search for claim 10 could not be carried out at all. Accordingly claim 10 has not been searched, and for those parts of claims 11-17 that refer to claim 10, no search could be carried out either.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/JP 01/03481

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Application No.
PCT/EP 01/03481

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0073501 A	07-12-2000	DE 19925073 A AU 5527700 A EP 1100958 A	15-03-2001 18-12-2000 23-05-2001
WO 0078344 A	28-12-2000	AU 5637500 A	09-01-2001
WO 0123425 A	05-04-2001	AU 5241100 A	30-04-2001

Form PCT/ISA-W/210 (published family member) (July 1992)

フロントページの続き(51)Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/566

G 0 1 N 33/566

A 6 1 K 37/47

(81)指定国 AP(CH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,S G,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ79 QR16 QS15 QS16 QS36 QX02

4C084 AA01 AA17 BA44 DC06 ZA022 ZA152